



T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SİRKADİYEN RİTİM BOZUKLUKLARINDA SERUM-HDL-
ERİTROSİT MEMBRANI ARASINDA FOSFOLİPİD TRAFİĞİ**

Dr. Fatma ÖLMEZ BUDAK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

MALATYA-2021



T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SİRKADİYEN RİTİM BOZUKLUKLARINDA SERUM-HDL-
ERİTROSİT MEMBRANI ARASINDA FOSFOLİPİD TRAFİĞİ**

Dr. Fatma ÖLMEZ BUDAK

ORCID: 0000-0003-4196-9224

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR

MALATYA-2021

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iii
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sirkadiyen Ritim	4
2.2. Sirkadiyen Ritim ve Moleküler Temeli.....	5
2.3. Sirkadiyen Ritim Bozuklukları	7
2.3.1. Sirkadiyen Ritim Uyku-Uyanıklık Bozuklukları.....	8
2.3.2. Gece Vardiyası	10
2.3.3. Jet Lag	10
2.3.4. Sosyal Jet Lag.....	11
2.3.5. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu Yapan Diğer Faktörler	12
2.4. Sirkadiyen Osilasyon Gösteren Lipid Metabolitler.....	12
2.5. Fosfolipid Transfer Proteini	17
2.5.1. PLTP Formları.....	19
2.5.2. PLTP Konsantrasyonunun ve Aktivitesinin Regülasyonu	19
2.5.3. PLTP ve HDL Regülasyonu	20
2.5.4. PLTP ve VLDL Sekresyonu.....	21
2.5.5. PLTP ve Tromboz	21
2.5.6. PLTP ve İnflamasyon	22
2.5.7. PLTP ve Ateroskleroz	22
2.5.8. PLTP ve Nörolojik Fonksiyonlar	23
2.5.9. PLTP ve Kanser.....	24
2.6. Lesitin: Kolesterol Açıltransferaz	24
2.7. Endotelyal Lipaz	27
2.7.1. Endotelyal Lipaz ve HDL-K Regülasyonu.....	28
2.7.2. EL Düzenlenme Mekanizmaları.....	28

2.7.3. EL ve Ateroskleroz.....	29
2.7.4. EL ve Metabolik Sendrom.....	30
2.7.5. EL ve Hipertansiyon.....	30
2.8. Fosfolipaz A ₂ Enzim Ailesi.....	31
2.8.1. Salgısal Fosfolipazlar	32
2.9. Melatonin	35
2.10. Kortizol	39
2.11. Metformin	45
2.12. Psöriazis	51
2.12.1. Derinin Bir Saati Var.....	51
2.12.2. Psöriazis ve İlgili Sirkadiyen Ritim Değişimleri.....	53
2.12.3. Uyku Yoksunluğu, Bağışıklık Fonksiyonu ve Psöriazis	54
2.12.4. Sirkadiyen Bozulmanın Cilt Üzerindeki Etkisi	55
2.13. Gece Vardiyası.....	55
2.13.1. Gece Vardiyası ve Metabolik Bozukluklar	56
2.13.2. Gece Vardiyası ve Kanseri Riski.....	57
2.14. Mavi Işık ve Sirkadiyen Ritim	58
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	60
3.1. Gereç	60
3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması.....	60
3.3. Numunelerin Hazırlanışı	62
3.3.1. Serumların Hazırlanışı.....	62
3.3.2. Serum HDL İzolasyonu	62
3.3.3. Eritrosit Süspansiyonu Hazırlanışı	63
3.3.4. Eritrosit, Serum ve HDL Süpernatant Lipid Ekstraksiyonu	63
3.5. Melatonin Analizi.....	64
3.6. PLTP Analizi.....	64
3.7. sPLA ₂ Analizi.....	65
3.8. LCAT Analizi.....	65
3.9. EL Analizi	66
3.10. Trigliserid Analizi	66
3.11. HDL-K Analizi.....	67
3.12. Kortizol Analizi.....	68

3.13. Total Kolesterol Analizi	68
3.14. VLDL-K Analizi	69
3.15. LDL-K Analizi	69
3.16. Fosfolipid Analizi.....	69
3.16.1. HPTLC metodu	69
3.16.2. HPLC Metodu	72
3.17. İstatistiksel Analizler.....	73
4. BULGULAR.....	75
4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Bazı Özelliklerin Karşılaştırılması	75
4.2. Serum Lipid ve Açlık Kan Şekeri Düzeyleri	77
4.3. Sirkadiyen Ritim Belirteçleri Olarak Serum Melatonin ve Kortizol Düzeyleri... 79	
4.4. Fosfolipid Trafiğinde Rol Alan sPLA ₂ , LCAT, EL, PLTP Protein Düzeyleri	82
4.5. Kontrol ve Hasta Gruplarının Serum, HDL ve Eritrosit Fosfolipid Kompozisyonları	86
4.5.1. Serum Fosfolipid Kompozisyonu	86
4.5.2. HDL Fosfolipid Kompozisyonu	89
4.5.3. Eritrosit Membran Fosfolipid Kompozisyonu.....	91
4.6. Kontrol ve Hasta Gruplarının Serum, HDL ve Eritrosit Fosfolipid Kompozisyonlarının HPTLC ile Analizi	94
5. TARTIŞMA	98
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	117
KAYNAKLAR	118
EKLER.....	147
EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	147
EK 2. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU	150

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim süresince bana yol gösteren, destek ve emeklerini esirgemeyen öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR'e, çalışmada emeği geçen Turgut Özal Tıp Merkezi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. İbrahim ŞAHİN ve Sayın Dr.Öğr.Üyesi Bahri EVREN'e ve asistanlarına, Turgut Özal Tıp Merkezi Dermatoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Serpil ŞENER'e ve asistanlarına, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Saliha Ebru BÜYÜKTUNCEL'e, Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Doç.Dr. Harika Gözde GÖZÜKARA BAĞ'a, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyeleri ve asistanlarına, Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Laboratuvarı personeline , Turgut Özal Tıp Merkezi Kan Alma Birimi personeline, Laborant Bülent ÇİLEDAĞ'a, Arş. Gör. Dr. Kevser TANBEK'e, Arş. Gör. Ahmet Kadir ARSLAN'a, çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan ve yardımlarını benden esirgemeyen Arş. Gör. Nilüfer BULUT'a ve Emine KOÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

TCD-2019-1928 numaralı tez projemin mali desteğini sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili eşim ve oğluma ve beni yetiştiren aileme sonsuz şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Serum-HDL-Eritrosit Membranı Arasında Fosfolipid Trafiği

Amaç: Sirkadiyen ritim bozukluğuna yol açan dört durumda, metformin kullanan hastalar, psöriazisli hastalar, T2DM tanısı yeni konmuş hastalar ve gece vardiyasında çalışanlarda serum-HDL-eritrosit membranı arasındaki fosfolipid trafiğinin ortaya koyulması amacıyla bu trafikte rol alan proteinlerin düzeylerinin (Fosfolipid transfer proteini, lesitin kolesterol açil transferaz, endotelyal lipaz ve salgısal fosfolipaz A₂) ve bu proteinlerle bağlantılı üç katmandaki (serum-HDL-eritrosit membranı) fosfolipid kompozisyonunun ortaya koyulması ve tüm bu verilerin sağlıklı bireylerin verileriyle karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Sirkadiyen ritim bozukluğuyla bağlantılı olduğu bilinen psöriazisli hastalar, yeni T2DM tanısı konmuş hastalar ve metformin kullanan hastalardan ve gece vardiyası çalışanlarından alınan kan numuneleri kullanıldı. Bu bireylerin serum PLTP, LCAT, EL, sPLA₂ ve melatonin düzeyi analizleri ELİSA yöntemiyle gerçekleştirildi. Kortizol analizi, kemilüminesans yöntemle yapıldı. Serum-HDL-eritrosit membranında fosfolipid analizleri HPLC ve HPTLC yöntemiyle yapıldı.

Bulgular: HPLC analizlerine göre eritrosit membranında tüm grupların PC alt fraksiyonu (PC4) değerleri kontrole göre yüksek saptandı. Serum LCAT, EL ve PLTP düzeyleri dört grupta da kontrole göre düşük saptandı. Diyabet, metformin ve vardiya gruplarında hiperlipidemi, psöriazis grubunda ise hipolipidemi gözlemlendi.

Sonuçlar: Sirkadiyen ritim bozuklukları eritrosit membran PC kompozisyonunda değişimlere yol açtı. Bu değişimlerin mekanizmasının oksidatif stres sonucu hasarlanan fosfolipidlerin fosfolipazlar tarafından başlatılan tamir işlemleriyle yağ asitlerinin yenileriyle değiştirilmesi olabileceği kanaatindeyiz. Eritrosit membran lipidlerinin analizi, sirkadiyen ritim bozukluklarının teşhisinde önemli bir biyobelirteç olabilir ve LC-MS/MS veya GC-MS/MS gibi tekniklerle membran fosfolipidlerinin yağ asidi kompozisyonunun analizi daha faydalı olabilir.

Anahtar kelimeler: EL, eritrosit membranı, fosfolipidler, kronobiyoloji bozuklukları, LCAT, PLTP, salgısal fosfolipaz A₂

ABSTRACT

Phospholipid Traffic Between Serum-HDL-Erythrocyte Membrane in Circadian Rhythm Disorders

Aim: In order to reveal the phospholipid traffic between serum-HDL-erythrocyte membrane in patients using metformin, patients with psoriasis, newly diagnosed patients with T2DM and night shift workers in four conditions selected from among the pathologies known to cause circadian rhythm disorders, the levels of proteins involved in this traffic (PLTP, LCAT, EL and sPLA₂) and the phospholipid composition in three layers (serum-HDL-erythrocyte membrane) in relation to these proteins and to compare all these data with those obtained from healthy individuals.

Materials and Methods: Serum PLTP, LCAT, sPLA₂, EL and melatonin levels of these individuals were analyzed by ELISA method. Cortisol analysis was done by chemiluminescence method. Phospholipid analyzes in serum-HDL-erythrocyte membrane were performed by HPLC and HPTLC methods. Serum Total-C, HDL-C and TG levels were analyzed by enzymatic colorimetric method.

Results: According to HPLC analysis, PC subfraction (PC₄) values of all groups in the erythrocyte membrane were higher than the control. Serum LCAT, EL and PLTP levels were found to be lower in all four groups compared to the control.

Conclusions: Circadian rhythm disorders led to changes in erythrocyte membrane PC composition. We believe that the mechanism of these changes may be the replacement of fatty acids with the repair processes initiated by phospholipases of phospholipids damaged as a result of oxidative stress. Analysis of erythrocyte membrane lipids can be an important biomarker in the diagnosis of circadian rhythm disorders, and analysis of the fatty acid composition of membrane phospholipids by techniques such as LC-MS/MS or GC MS/MS may be more useful.

Key words: EL, erythrocyte membrane, phospholipids, chronobiology disorders, LCAT, PLTP, secretory phospholipase A₂

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABCA1	: ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı protein A1
ACTH	: Adrenokortikotropik hormonun
AICAR	: 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1-beta-d-ribofuranosid
AKŞ	: Açlık kan şekeri
AMPK	: AMP ile aktive olan protein kinaz
BHT	: 2,6-di-terciyer-bütil-4-hidroksitoluen
BMAL1	: Beyin-kas-arnt benzeri protein 1
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
BPI	: Bakteri öldürücü / geçirgenliği artıran protein
CETP	: Kolesterol ester transfer proteini
CK 1	: Kazein kinaz 1
CLOCK	: Sirkadiyen lokomotor çıkış döngüsü kaput
CRH	: Kortikotropin salgılatıcı hormon
CRSWD	: Sirkadiyen Ritim Uyku-uyanıklık Bozuklukları
EL	: Endoltelyal lipaz
GLUT4	: Glukoz transporter 4
HBA	: Hidroksibenzoik asit
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HPA	: Hipotalamik-hipofiz-adrenal bez
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPTLC	: Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi
HSPG	: Heparan sülfat proteoglikan
JAK2 / STAT3	: Janus kinaz 2 / sinyal dönüştürücü transkripsiyon aktivatörü 3
KKH	: Koroner kalp hastalığı
LCAT	: Lesitin kolesterol açıl transferaz

LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LizoPC	: Lizofosfatidilkolin
LPS	: Lipopolisakkarit
PBS	: Fosfat buffer solüsyonu
PC	: Fosfatidilkolin
PE	: Fosfatidiletanolamin
PLA₂	: Fosfolipaz A ₂
PLTP	: Fosfolipid transfer protein
PS	: Fosfatidilserin
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asidi
S1P	: Sfingozin-1-fosfat
SCN	: Suprakiazmatik nukleus
SM	: Sfingomiyelin
sPLA₂	: Salgısal fosfolipaz A ₂
SR-B1	: Scavenger receptor-B1
T2DM	: Tip 2 diyabet
TG	: Trigliserid
Total-K	: Total kolesterol
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Melatonin sentez basamakları	36
Şekil 2.2. Melatoninin insan plazma konsantrasyonlarının sirkadiyen osilasyonu	37
Şekil 2.3. Kortizol sentezinin basamakları	41
Şekil 2.4. Normal koşullardaki bireylerin tükürük ve plazma kortizol seviyelerinin sirkadiyen ritimleri.....	42
Şekil 2.5. Galegin, metformin ve fenforminin kimyasal yapıları.....	46
Şekil 3.1. HPTLC’de lipid spotlarının fotodansitometrik analizi.....	71
Şekil 4.1. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum melatonin düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.2. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum kortizol düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	80
Şekil 4.3. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum sPLA ₂ düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.4. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum LCAT düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	83
Şekil 4.5. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum EL düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.6. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum PLTP düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.7. Serum lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı	87
Şekil 4.8. HDL lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı	89
Şekil 4.9. Eritrosit lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı	92
Şekil 4.10. Serum lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı	94
Şekil 4.11. HDL lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı.....	95
Şekil 4.12. Eritrosit lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı.....	95

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Sirkadiyen ritim bozulmasının kaynakları ve birincil mekanizmaları	8
Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarına ait bazı demografik veriler	76
Tablo 4.2. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum AKŞ ve lipid düzeyleri.....	78
Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum melatonin ve kortizol düzeyleri.....	81
Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum sPLA ₂ , LCAT, EL ve PLTP düzeyleri	85
Tablo 4.5. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait serum fosfolipid % değerleri	88
Tablo 4.6. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait HDL fosfolipid % değerleri	90
Tablo 4.7. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait eritrosit membranı fosfolipid % değerleri	93
Tablo 4.8. Kontrol ve hasta gruplarının eritrosit numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri	96
Tablo 4.9. Kontrol ve hasta gruplarının HDL numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri	96
Tablo 4.10. Kontrol ve hasta gruplarının serum numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri	97

1.GİRİŞ

Sirkadiyen ritim, yaklaşık 24 saatlik bir periyota sahip davranışsal, fizyolojik ve moleküler değişikliklerdir (1). Yeryüzündeki tüm canlılar, fizyolojilerini, metabolizmalarını ve davranışlarını kontrol eden 24 saatlik osilasyon mekanizmasına sahiptir (2). Sirkadiyen ritimler, aydınlık-karanlık döngüsü, beslenme ve sıcaklık gibi belirli harici ipuçlarıyla senkronize olabilirler (3). Böylece organizmalar aktivitelerini günün en uygun zamanına göre gerçekleştirebilirler. Sirkadiyen sistem, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde (SCN) bulunan merkezi saat ve vücudun çeşitli dokularında bulunan periferik saatlerden oluşur (1). SCN'deki merkezi saat için ana uyarıcı ışıktır (1) ve periferik saatleri senkronize eder (4). Karaciğer, bağırsaklar, kalp, retina gibi birçok periferik organ ve dokuya dağılan periferik saatler (1) ise sıcaklık, hormonlar, besinler ve fiziksel aktivite gibi çevresel faktörlerle uyarılırlar (5). Birlikte çalışan ve merkezi saat tarafından senkronize edilen tüm bu saatlerin varlığı, parakrin ve sinaptik sinyaller yoluyla sirkadiyen sistem üzerinde çift yönlü etkileşim halindedir (1).

Çevresel ritimler ve endojen sirkadiyen ritimler arasındaki senkronizasyon bozuklukları sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açmaktadır (6). Modern yaşam tarzının getirdiği elektrik ve buna bağlı olarak ışığa, enerjiye ve yiyeceğe sürekli erişimin yanı sıra gece vardiyalı çalışma programları ve zaman dilimleri arasında seyahat, insan sirkadiyen fizyolojisinde bozulmalara sebep olmaktadır (7). Öte yandan bazı ilaç kullanımlarının, yüksek yağlı besin tüketiminin ve uyku kısıtlamalarının da biyolojik ritimleri bozduğu ve metabolik disfonksiyonlara yol açtığı belirtilmektedir (5).

Çalışmalar, sirkadiyen ritim bozukluklarının, endokrin bozukluklar (8), zihinsel bozukluklar (9), metabolik sendrom (10,11), nöropsikiyatrik bozukluklar (12) ve kardiyovasküler hastalıklarla (13) sonuçlanabileceğini göstermektedir.

Yetersiz uykuya bağlı olarak gelişen sirkadiyen ritim bozukluklarında yapılan çalışmalar özellikle lipid metabolizmasındaki değişime işaret etmektedir. Uyku kısıtlanmalı koşullarda insan ve ratlarda kandaki iki metabolitin, oksalik asit ve diaçilgliserol (36:3)'ün önemli oranda azaldığı, uyku kısıtlamasının olmadığı zamanlarda ise normal düzeylere geldiği gözlenmiştir. Ayrıca her iki türde de fosfolipidlerin yükseldiği, en çok yükselenlerin ise fosfatidilkolin (PC), lizofosfatidilkolin (LizoPC), fosfatidiletanolamin (PE) ve sfingomiyelin (SM) olduğu belirtilmiştir (14). Sağlıklı bireylerde yapılan plazma metabolomik incelemeleri bu

lipidlerin serum düzeylerinin sirkadiyen kontrol altında olduğunu ve günlük osilasyonlar gösterdiğini tespit etmiştir (15). Gliserolipid sentezi ve fosfolipazlar ile ilgili genler de memelilerde sirkadiyen ritim gösteren genler arasındadır (16,17). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, sirkadiyen ritim bozukluklarının gliserofosfolipid metabolizmasıyla bağlantılı olduğunu göstermektedir. Bu fosfolipidler hücre membranının dış katmanının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle bu veriler, sirkadiyen saatin hücre membranının fonksiyonunu etkileyebileceğini ve bunun sonucunda reseptör sinyalizasyonunda önemli etkileri olabileceğine işaret etmektedir (18).

Bu fosfolipid metabolitlerinin üretiminden ve lipoproteinler arasındaki transferinden sorumlu proteinler arasında fosfolipid transfer protein (PLTP), lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT), salgısal fosfolipaz A₂ (sPLA₂), endotelial lipaz (EL) yer alır. PLTP, HDL'ye bağlı olarak dolaşır ve fosfolipidlerin tek katmanlı veziküller arasında HDL'ye net transferine ve ayrıca lipoproteinler arasında fosfolipidlerin değişimine aracılık eder (19) ve trigliseritten zengin lipoproteinlere doğru kolesterol ester transferini teşvik edebilir (20). LCAT, plazma kolesterol esteri oluşumu, yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin (HDL) olgunlaşması ve ters kolesterol transportunda önemli rollere sahip bir enzimdir. sPLA₂'ler, membran gliserolipidlerinin sn-2 pozisyonundaki ester bağı, yağ asidi seçiciliği göstermeksizin Ca⁺² varlığında hidrolize eden enzimlerdir (21). EL ise primer olarak fosfolipaz aktivitesi gösteren ve HDL partüküllerinin yeniden şekillenmesini ve plazmadan uzaklaşmasını sağlayan bir enzimdir (22,23).

Sirkadiyen ritim bozukluklarına bağlı olarak bu proteinlerin düzey veya aktivitelerinde meydana gelen değişimler serum fosfolipid homeostazisini etkileyebilir. Bu serum fosfolipid homeostazisindeki değişimin takibinin çalışmamızda üç katmanda yapılması planlanmıştır. Çünkü bu proteinlerin faaliyetlerini yürüttüğü üç katman; HDL, hücre membranı (eritrosit membranı) ve serumdur.

Melatonin uyku-uyanıklık döngüsünü düzenler, aynı zamanda endojen bir senkronizör ve kronobiyotik bir molekül; yani osilasyonları güçlendiren veya bedensel ritimleri stabilize etmek için hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeklerinde bulunan merkezi saatin zamanlamasını ayarlayan bir madde olarak kabul edilmektedir (24). Kortizol ise sekresyonu sirkadiyen saat tarafından kontrol edilen ve vücuttaki hücre-

otonom saatlerin senkronizasyonunda rol oynayan diğ er bir hormondur (25). Sekresyonlarının belirgin bir sirkadiyen ritme tabi olması nedeniyle melatonin ve kortizol düzeylerini sirkadiyen faz belirteçleri olarak kullanmak mümkündür ve sirkadiyen ritimlerin izlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (26).

Sirkadiyen ritim bozukluklarına neden olduğu bilinen dört durum seçilmiştir. Bunlardan birincisi tip 2 diyabet (T2DM)'dir (27). İkincisi, prediyabetli ve diyabetli hastaların tedavisinde metformin kullanımınıdır (28).  c nc  durum ise sirkadiyen ritim bozukluğu bildirilen bir hastalık olan ps riazistir (29). Dördüncü durum ise gece vardiyasında çalışmaktır (30). Çalışmamızda bu dört gruptaki insan deneklerin kan  rneklelerinde fosfolipid metabolizması ile ilgili sPLA₂, LCAT, PLTP ve EL düzeyleri ile serum, HDL ve eritrosit membranındaki fosfolipid kompozisyonlarının kontrole göre karşılaştırılarak sirkadiyen ritim değişikliklerinde bozulan serum fosfolipid homeostazisinin mekanizmasının ve klinik tanı ve uygulamalarda olası faydalarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Sirkadiyen Ritim

Yeryüzündeki her organizma, dünyanın güneş etrafında dönmesiyle oluşan gece gündüz döngüsünü tahmin etmek ve bunlara tepki vermek için günün saatini bilme yeteneğine ihtiyaç duyar. Biyolojik süreçler ve işlevler, ultradian (yüksek frekans/24 saatten kısa), sirkadiyen (yaklaşık 24 saat), sirkamensual (yaklaşık aylık) ve sirkannual (yaklaşık yıllık) ritimlere sahiptir ve bunlar menarş, üreme, menopoz ve kış uykusu ile bağlantılıdır (2). Yaklaşık 24 saatlik bir periyot uzunluğuna sahip davranışsal, fizyolojik ve moleküler değişiklikler ‘‘Sirkadiyen ritim’’ olarak adlandırılır (1). Sirkadiyen ritimler; periyot, faz, amplitüd gibi parametrelere sahiptir. Bir olayın meydana geldiği siklus içinde geçen süre fazı, (örn. gece fazının başlaması), bir sirkadiyen fazdan tekrar aynı faza geçmek için geçen süre periyodu ifade eder. Döngüdeki tepe noktası ile dip noktası arasındaki fark ise ritmin amplitüdü olarak tanımlanır (31). Sirkadiyen ritimler, kendilerini sürdürürler, harici zaman uyararı olmadan devam ederler, ancak aydınlık-karanlık döngüsü, beslenme ve sıcaklık gibi belirli harici ipuçlarıyla senkronize olmak için osilasyon fazlarını değiştirebilirler (3). Sirkadiyen sistem, hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeğinde (SCN) bulunan merkezi saat ve vücudun çeşitli dokularında bulunan periferik saatlerden oluşur (1). SCN, organizmadaki hemen hemen her işlevin düzenli osilasyonunu belirleyen bir kronometredir; sirkadiyen ritimlerin merkezi üreticisidir (32). SCN, *in vitro* ortama transfer edildiğinde günlerce güçlü sirkadiyen ritmikliğini koruyabilir. Diğer birçok periferik doku (örneğin karaciğer, akciğer, iskelet kası) da *in vitro* ritmiktir, ancak osilasyonlar çok daha az sağlamdır ve uzun sürmez, bu da periferik dokuların SCN tarafından yönetilen sönümlü osilatörler içerdiğini düşündürmektedir (33).

SCN, ventral çekirdekte vazoaktif intestinal peptid üreten nöronlar ve dorsal kabukta vazopressin hücreleri dahil olmak üzere heterojen bir nöron tipi popülasyonu içerir (34). SCN için ana uyarıcı ışıktır (1). Fotoperiyot; siyanobakteriler, mantarlar, yeşil bitkiler ve metazoanlar dahil olmak üzere incelenen tüm organizmalarda sirkadiyen osilatörlerin fazlarını belirleyen baskın çevresel Zeitgeber'dir (zaman belirleyici) (4). Uzmanlaşmış SCN nöronları, retinohipotalamik yolun aksonları tarafından sinaptik iletim yoluyla retinadan ışık uyarısını ve farklı nöral girdilerden

ışıkla ilgili olmayan ipuçlarını alır. Bu elektriksel bilgi, SCN nöronlarının bir alt kümesinde saat genlerinin ekspresyonunun fazını değiştiren kimyasal bilgiye dönüştürülür. SCN daha sonra ritmik bilgisini parakrin ve sinaptik sinyaller yoluyla diğer beyin bölgelerindeki hücelere ve periferik organlara iletir ve böylece periferik saatleri senkronize eder. Örneğin, dinlenme-aktivite döngüleri, karaciğer, pankreas, böbrek, kalp ve iskelet kasları gibi birçok periferik organ için baskın zaman belirleyici açlık/tokluk ritimleri üretir. Beslenme ritimlerinin periferik saatleri senkronize ettiği moleküler yollar hala tam olarak anlaşılmamış olsa da, besin algılayıcı hormonların veya hücre içi metabolitlerin dahil olabileceği düşünülmektedir (4). Kör bireylerin de sirkadiyen döngüleri vardır (örneğin, uyku-uyanıklık döngüleri) ve bu döngü 24 saatten uzun sürer. Bu bulgu, ışığa ek olarak diğer uyaranların da insan biyolojik saati için bir uyaran görevi görebileceği fikrini desteklemektedir (1).

Hemen hemen her dokunun her hücresinin bağımsız osilatörleri vardır; dalak, lenf düğümleri ve izole edilmiş makrofajlar, sistemik zaman bilgisi olmadan bile çalışan otonom hücresel osilatörler içerir. Sirkadiyen ritim üretimi, hücreden bağımsız ve hücre ritminin temel mekanizmasıdır; SCN ve periferik hücrelerde yüksek oranda korunur (2). 2000'li yıllarda yapılan çalışmalar, karaciğer, bağırsak, kalp ve retina gibi birçok periferik organ ve dokuda bulunan otonom sirkadiyen osilatörlerin olduğu ve hücresel saat genleri aracılığıyla bu organlarda/dokularda metabolik süreçlere katkıda bulunduğunu göstermiştir (1). Sıcaklık, hormonlar, besinler, besinlerin bileşimi, bazı besinler (örneğin, glikoz, amino asitler, etanol ve retinoik asit), beslenme/açlık durumu, uyku-uyanıklık durumu ve fiziksel aktivite çeşitli periferik saatler yoluyla sirkadiyen ritim üzerinde etkilidir (5). Periferik saatler, çeşitli fizyolojik işlevlerde yer alan spesifik genlerin sirkadiyen ekspresyonunu yönlendirerek, ilgili dokularının her birinde ayrılmaz ve benzersiz bir rol oynar. Birlikte çalışan ve merkezi saat tarafından senkronize edilen tüm bu saatlerin varlığı, birçok hormon ve gün içinde değişen fizyolojik veya çevresel değişkenler vasıtasıyla sirkadiyen sistem üzerinde çift yönlü etkileşim halindedir (1).

2.2. Sirkadiyen Ritim ve Moleküler Temeli

Memelilerde sirkadiyen saat homeostazı; transkripsiyon, translasyon ve translasyon sonrası değişimleri kapsayan geri besleme (negatif) ve ileri beslemeli (pozitif) mekanizmalar tarafından sağlanır (1). CLOCK (sirkadiyen lokomotor çıkış döngüsü kaput) ve BMAL1 (beyin-kas-arnt benzeri protein 1) saat genleri pozitif

feedback mekanizmasına, PER1, PER2, CRY1 ve CRY2'ler de negatif feedback mekanizmasına aracılık etmektedir.

CLOCK, transkripsiyon faktörü BMAL1 ile bir heterodimer oluşturur. Heterodimer CLOCK/BMAL1, bir dizi başka transkripsiyon faktörü ile birlikte biyolojik saat sisteminin kontrolü altında gen ekspresyonunun sirkadiyen salınımlarından sorumludur (35). CLOCK ve BMAL1 heterodimeri, PER ve CRY genlerindeki E-promoter bölgesine bağlanır ve PER ve CRY genlerinin ekspresyonları indüklenir. Bu gündüz meydana gelir. Daha sonraki aşamada, PER ve CRY heterodimerize olur ve CLOCK/BMAL1 ile indüklenen gen ekspresyonunu inhibe etmek için sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirir (1). Yeterli seviyelerde çekirdekte biriken PER ve CRY proteinleri CLOCK/BMAL1'in aktivasyonunu baskırlar. Bu gece meydana gelir. Yarı ömürleri kısa olan PER/CRY proteinleri, proteazom aracılı PER/CRY bozunmasını müteakip protein seviyeleri düşmeye başlar. Bu sabahın erken saatlerinde meydana gelir (36). Sonuç olarak, PER ve CRY genleri downregüle edilir, PER ve CRY aracılı inhibisyon azalır ve CLOCK/BMAL1 aktivasyonu ile yeni bir transkripsiyon/translasyon döngüsü başlar (35). Bu negatif feedback mekanizması sirkadiyen sistemin etkin bir şekilde çalışması için önemlidir (1). Bu transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngüsü, yaklaşık 24 saatlik bir aralıkla tekrarlanır ve günlük aralıklarla, yani sirkadiyen olarak kabul edilir. Bu biyolojik saatlerin önemli bir özelliği, dış ipuçlarıyla sürekli eğitime bağımlı olmalarıdır. Böylece, ışığa günlük maruz kalma, merkezi SCN saatinin periyodikliğinin korunmasına yardımcı olur (37).

Bu doğrudan transkripsiyonel geri bildirim ek olarak, PER1/2/3 ve Cry1/2'nin mRNA ekspresyonları da çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenir. PER ve CRY proteinlerinin yıkımı serin/treonin kinazlar, CK1 δ ve CK1 ϵ diğerleri, F-box proteinleri, FBXL3 ve FBXL21 ve diğer proteinler tarafından düzenlenir. Memeli sirkadiyen saat gen ağını düzenleyen birkaç ek gen ve geri bildirim döngüsü ortaya çıkarılmıştır. Burada nükleer reseptörler Rev- Erb α ve Rev-Erb β ve retinoik asit reseptörü ile ilgili yetim reseptörler (ROR α , - β ve - γ 'den oluşan ROR'lar), BMAL1'in ritmik ekspresyonunu regüle eder. CLOCK/BMAL1, REV-ERB α ve REV-ERB β nükleer reseptörlerinin transkripsiyonunu aktive ederken, BMAL1 geninin ekspresyonu ROR'lar tarafından uyarılır, REV-ERB'ler tarafından baskılanır. Diğer bir döngüde ise D-box bağlayıcı proteini ve nükleer faktör interlökin-3 ile düzenlenen proteini, ROR promoter bölgesindeki D-kutularına bağlanarak ROR'ların ekspresyonunu regüle eder

ve ROR aracılı BMAL1'in ekspresyonu uyarılır. Bu transkripsiyonel-tanslasyonel düzenleyici mekanizmalar dışında da ritmik döngüler vardır (3).

2.3. Sirkadiyen Ritim Bozuklukları

“Sirkadiyen bozulma” terimi 1980'lerden beri kullanılmaktadır (38), ancak gece ışığı, endokrin bozukluk ve meme kanseri riski arasında bir ilişki olduğu fark edildiğinde daha çok gündeme gelmeye başlamıştır (39). O zamandan beri yaygın olarak kullanılmakta, ancak tanımı belirsizliğini korumaktadır ve farklı terminolojiler birbirinin yerine kullanılmaktadır. Sirkadiyen zaman uyumsuzluğu (40), desenkronizasyon (41) ve kronodisrupsiyon (42) yaygın kullanılan terimlerdir ve her biri için hücre, doku ve organizma düzeyinden sistemik düzeye kadar farklı biyolojik seviyelerde meydana gelen sirkadiyen bozulma türleri olarak kabul edilirler.

Bazı araştırmacılar da sirkadiyen aksamayı, dış etkenlere (örneğin, vardiyalı çalışma, jet lag), iç etkenlere (örneğin körlük) bağlı sirkadiyen senkronizasyon bozukluğu veya değişik patolojilerden (örn., tümör, lezyon veya hastalık) veya zararlı genetik varyasyonların neden olduğu SCN hasarından kaynaklanan sirkadiyen fonksiyon bozukluğu olarak tanımlamışlardır (43). Bu tiplendirme faydalı olsa da, fenomenin kendisini tanımlamaktan ziyade daha çok potansiyel olarak sirkadiyen bozulmaya neden olan senaryolarla ilgilidir (7).

Bir başka görüş ise “sirkadiyen bozulma”yı, bireysel hücrelerdeki moleküler ritimlerden çevresel değişikliklerle davranış döngülerinin desenkronizasyonuna kadar farklı organizasyonel seviyelerde ve/veya farklı organizasyon seviyeleri arasında meydana gelebilen biyolojik zaman uyumunun bir bozukluğu olarak yorumlanmıştır (44).

Sirkadiyen sistem; biyokimyasal, fizyolojik ve davranışsal süreçlerin günlük zamanlamasını optimize eder (45). Modern yaşam tarzının getirdiği elektrik ve buna bağlı olarak ışığa, enerjiye ve yiyeceğe sürekli erişimin yanı sıra 7/24 çalışma programları ve zaman dilimleri arasında seyahat, 200 yıl öncekinden temel olarak farklı bir yaşam tarzı yarattı. Teknolojik ve yaşam tarzı değişikliklerinin günlük yaşam üzerinde olumlu etkileri olsa da, insanların doğal aydınlık-karanlık, uyku-uyanıklık döngüsünden uzaklaşmaları, insan sirkadiyen fizyolojisinde değişimlere sebep olmaktadır (7).

Tablo 2.1. Sirkadiyen ritim bozulmasının kaynakları ve birincil mekanizmaları (7).

Kaynak	Mekanizma				
	Çevresel Aydınlık- Karanlık Döngüsü Bozulması	Davranışsal		Biyolojik	
		Beslenme/ Açlık Döngüsü Bozulması	Dinlenme/ Aktivite Döngüsü Bozulması	Genetik Bozulma (örn. Saat Gen Mutasyonları)	Fizyolojik Bozukluk (örneğin, Retina Disfonksiyonu)
Çalışma programları (örneğin, vardiyalı çalışma, sosyal jet lag, okula erken başlama saatleri)	+	+	+	-	-
Olağandışı fotoperiyotlar (örneğin, kutup bölgeleri)	+	-	-	-	-
Jet lag	+	+	+	-	-
Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık bozuklukları	+	-	-	+	+
Yaşlılık	-	-	-	-	+
Hastalık (örn.Alzheimer)	-	-	-	+	+

Çevresel ve/veya genetik manipülasyonlarla sirkadiyen sisteme müdahale etmek, endokrin bozulma (8), zihinsel bozukluklar (9), metabolik sendrom (10,11), nöropsikiyatrik bozukluklar (12) ve kardiyovasküler bozukluklarla (13) sonuçlanabilir. Bu sonuçların, çevresel ritimler ve endojen sirkadiyen ritimler arasındaki uyum bozukluğu dahil olmak üzere sirkadiyen bozulmadan kaynaklandığı ve aynı zamanda sirkadiyen sistemin farklı bileşenleri arasındaki bir uyum bozukluğundan kaynaklandığı varsayılmıştır (6).

2.3.1. Sirkadiyen Ritim Uyku-Uyanıklık Bozuklukları

İnsan türü olarak gece uyumayı ve gündüz aktif olmayı tercih eder. Bu temel fenomen iki temel mekanizma tarafından kontrol edilir. Bunlardan biri, genellikle 24 saatten biraz daha uzun bir periyodu olan uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyen, doğuştan gelen bir iç ritim belirleyicidir. İkinci mekanizma, iç ritim belirleyici sistemin çevresel zaman ipuçlarıyla harici 24 saatlik gün ile senkronizasyonunu içerir. En güçlü

zaman belirleyici olarak kabul edilen parlak ışığın bu süreçte çok önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (46). Bununla birlikte, uyku-uyanıklık döngüsünde normal olarak kabul edilen senkronize 24 saatlik ritmin farklı olduğu kişiler vardır (47). Bu kişiler sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık bozuklukları olarak adlandırılan bozukluktan muzdariptirler.

Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık bozuklukları, sirkadiyen sistemin endojen zamanlamasının dış 24 saatlik ortamla uyumsuzluğundan kaynaklanan uyku bozukluklarıdır (48). Altta yatan sorun, uyku istendiğinde, ihtiyaç duyulduğunda veya beklendiğinde hastanın uyuyamamasıdır. Uyku epizodları uygun olmayan zamanlarda meydana gelir ve bunun sonucunda istenmeyen zamanlarda uyanma periyotları meydana gelir (49). Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık bozukluğu (CRSWD) olan bireyler sadece uyku-uyanıklık döngüsünde bir sapmadan değil, aynı zamanda vücut ısısı, melatonin, büyüme hormonu ve kortizol salgılanması ve düzensiz yemek yemeye sebep olan açlık hissetme zamanları gibi diğer sirkadiyen ritimlerdeki bozukluklardan muzdariptirler. CRSWD hastalarının “sirkadiyen saatleri”nin çevresel ortamın taleplerine uyum sağlayamamak bir katılıkta olduğu tahmin edilmektedir. Bulgular, CRSWD hastalarının büyük bir yüzdesinin aynı zamanda bir öğrenme (%19,3) ve/veya kişilik bozukluğu (%22,4) teşhisine sahip olduğunu desteklemektedir. CRSWD'nin tanımı ve teşhisi için kullanılan kriterler International Classification of Sleep Disorders (ICSD) tarafından verilmektedir (49).

CRSWD'ler dört alt grupta incelenir:

- 1- Gecikmiş Uyku-Uyanıklık Fazı Bozukluğu
- 2-İleri Uyku Fazı Sendromu
- 3-Yirmi Dört Saat Olmayan Uyku-Uyanıklık Sendromu
- 4-Düzensiz Uyku-Uyanıklık Paterni

Sirkadiyen bozuklukların en önemli kaynaklarından biri günümüzde yaygın olan bazı meslek gruplarının (sağlık, askeri, güvenlik, vb.) maruz kaldığı gece vardiyalı çalışma sistemidir ve özellikle gece çalışmasını içeren dönüşümlü programlardır (50).

2.3.2. Gece Vardiyası

Biyolojik gece boyunca çalışmak sirkadiyen sistem için en büyük zorluk olarak kabul edilmektedir (51). Gece çalışma sistemi; gece boyunca yapay ışığa maruz kalma, gece yemek yeme ve kalori alımı, uyku saatlerinde uyanık ve aktif olmak, psikososyal stres ve ayrıca geceleri sigara ve kafein gibi uyarıcılar tüketmek gibi sirkadiyen sistemde aksamalar yapan birden çok faktör içermektedir (51). Bütün bu faktörler, endojen sirkadiyen ritimler ve günlük davranışlar arasında uyumsuzluklara sebep olur ve bu sirkadiyen aksama, yorgunluk ve kötü uyku kalitesi (52), psikososyal stres (50), gastrointestinal şikayetler (53), olumsuz metabolik değişiklikler ve obezite ve diyabet risklerinin artması (54) dahil olmak üzere olumsuz sağlık sonuçlarına sebep olabilir (55).

Vardiyalı çalışma ve sağlıkla ilgili epidemiyolojik araştırmalar, özellikle 5 yıl veya daha uzun süre boyunca vardiyalı çalışmaya maruz kalmanın özellikle kronik hastalık gelişimi için uyarıcı olduğunu göstermektedir (56). Geleneksel olmayan çalışma programlarına maruz kalma, artan kolorektal (57), meme (58), lenfatik (59) ve prostat (60) kanserlerinin yanı sıra mide ülserleri (53), obezite (61), diyabet, inme, KKH (62), ateroskleroz ve kalp krizi (63) riskiyle ilişkilendirilmiştir. Vardiyalı çalışmaya maruz kalma ve hastalık arasındaki bu korelasyonların mekanizmaları bilinmemektedir, ancak bu patolojilerin çoğu tarafından paylaşılan ortak bir risk faktörünün inflamasyon ve bağışıklık sisteminin düzensizliği olduğunu belirtmek önemlidir (50). Metabolik ve otoimmün hastalıklara ek olarak, gece vardiyasında çalışanlar, depresyon ve anksiyete gibi duygudurum bozuklukları için de yüksek risk altındadır (64). Son *in vivo* çalışmalar, anormal bir ışık döngüsünün ruh halini ve öğrenmeyi bozduğunu göstermiştir (65). Düzensiz ışık değişikliklerine maruz kalan farelerde de, depresif davranış ve bozulmuş öğrenme işlevi gösterilmiştir (65).

2.3.3. Jet Lag

Bir veya daha fazla zaman diliminde doğuya veya batıya hızlı seyahat ederken ilişkili yerel aydınlık-karanlık döngüsü ile biyolojik saatlerin geçici desenkronizasyonundan kaynaklanan bir sendromdur (31). Jet lag, uyku bozuklukları, gündüz yorgunluğu, düşük performans, gastrointestinal problemler ve genel halsizlik ile karakterizedir. Beş veya daha fazla zaman dilimini geçen çoğu hava yolcusunu etkiler; doğuya doğru olan uçuşlar, batıya doğru olan uçuşlardan daha kötüdür ve

geçilen zaman dilimi sayısı ve uçuş süresi arttıkça jet lag'ın görülme sıklığı ve şiddeti artar (66). Neredeyse tüm kritik jet lag semptomlarına vücudun uyku ve uyanma programlarının bozulması neden olur (67). Melatoninin, sirkadiyen sistemi düzenleme yeteneğinden dolayı, çok boylamlı seyahatlerde yaşanan rahatsızlıkları tedavi etmede son derece başarılı olduğu gösterilmiştir. Melatonin, bozulmuş sirkadiyen ritimleri yeniden ayarlama işlevi görür ve jetlag ve gecikmiş uyku fazı sendromu ve vardiyalı çalışma ile ilgili bozukluklar gibi sirkadiyen ritimlerle ilgili diğer rahatsızlıklarda uykuya yardımcı olur (67).

2.3.4. Sosyal Jet Lag

Bu kavram ilk olarak 2006 yılında Roenneberg ve meslektaşları tarafından bir bireyin biyolojik saati ile sosyal saati arasındaki zaman uyumsuzluğunu tanımlayan ve ölçen bir kavram olarak önerilmiştir (6). Sirkadiyen bozulmanın yaygın bir diğer örneği olan sosyal jet lag (SJL)'de, çalışma ve dinlenme günleri arasında uyku ve uyanma zamanlama farklılıkları gözlenir (68). Bireylerin sürüklenme aşamasını değerlendirmek için basit, hızlı, noninvaziv ve ölçeklenebilir bir araç olan Münih Kronotipi Anketi geliştirilmiştir. Münih Kronotipi Anketi sayesinde bireylerin uyku-uyanma davranışları analiz edilir ve kronotip tahminleri yapılır. Bireylerin uyku günlüklerinden faydalanarak uyku zamanlamaları ve süreleri değerlendirilir ve çalışma ve dinlenme günlerinde uyku ortası noktalarının ortalaması arasındaki fark, SJL olarak tanımlanır ve sirkadiyen uyumsuzluk ölçütü olarak kullanılabilir.

$$SJL=MSF-MSW$$

(MSF: Boş günlerin uyku ortası, MSW: İş günlerinin uyku ortası) (69)

Birçok deneğin uyku kaydı verileri, Cuma akşamları birkaç saat diliminde batıya uçuyor ve Pazartesi sabahları seyahatten dönüyormuş gibi görünmekte olduğu fark edilmiş ve bu nedenle bu sendrom SJL adlandırılmıştır (68). SJL, jetlag gibi geçici değil kronik olarak yaşanan bir sendromdur (69) ve özellikle bireylerin %69'unda SJL görülmektedir (68). Tipik olarak, SJL geç kronotiplerde daha büyüktür. İş günlerinde, geç kronotiplerin uykusu gecenin her iki ucunda da kısıtlanır. İşsiz günlerde ise, geç kronotipler daha geç ve daha uzun uyurlar (çalışma haftası boyunca biriken uyku borcunun neden olduğu aşırı uyku).

SJL ile ilişkili birkaç davranışsal sonuç vardır: sağlıksız beslenme düzenleri (70), daha yüksek sigara ve alkol içme olasılığı (68). Ayrıca SJL ile metabolik bozukluklar ve/veya obez olma riski arasında bir ilişki olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır (10).

2.3.5. Sirkadiyen Ritim Bozukluğu Yapan Diğer Faktörler

Bazı bireyler artan sirkadiyen ritim ve uyku bozukluğu riski altındadır. Bazen bu çevre odaklıdır. 24 saat diliminin tümü, örneğin düşük amplitüdü aydınlık-karanlık döngülerinin ve aşırı sıcaklıkların sağlık sonuçlarıyla ilişkili olduğu kutuplarda görülür (71). Sirkadiyen bozulmalara sebebiyet veren bir başka durum da tıbbi patolojilerdir. Altta yatan patolojilere bağlı olarak uyku kalitesinin oldukça değişken olduğu, 24 saatlik olmayan uyku/uyanıklık ritmi bozukluğu yaşayan, ışık algısı olmayan kör bireylerde (72) sirkadiyen ritim bozulması ortaya çıkmaktadır. SCN'ye girdilerin azaldığı yaşlılık (73) ve onun getirdiği bazı hastalıklar da (Örn. Alzheimer gibi) (74) sirkadiyen ritim bozukluğuna örnek verilebilecek durumlar arasındadır (7).

Sirkadiyen ritimler insan fizyolojisinin birçok yönünü düzenlemesine rağmen, metabolomun ritmik kontrolü tam olarak anlaşılamamıştır. Bu amaçla insan plazmasında sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitleri tanımlamak için birden çok araştırma yapılmıştır. Sağlıklı insanların plazmasında yapılan metabolomik bir incelemede tespit edilen metabolitlerin %19'unun gün içinde önemli farklılıklar gösterdiği ve bu metabolitler arasında kortikosteroidler, bilirubin, amino asitler, açilkarbitinler ve fosfolipidlerin bulunduğu belirtilmiştir (15).

2.4. Sirkadiyen Osilasyon Gösteren Lipid Metabolitler

Lipidler, hücre zarlarının ve lipoproteinlerin ayrılmaz bileşenleridir ve enerji depolama ve taşıma için önemlidir. Lipidler ayrıca hücre fizyolojisi üzerinde yaygın etkileri olan hücre içi ve hücreler arası sinyal molekülleri olarak işlev görür (75). Lipid metabolizması, transkripsiyonel düzenleme ve hücre döngüsünde yer alan genler dahil olmak üzere binlerce DNA bağlanma bölgesi BMAL1 tarafından ritmik olarak işgal edilir. Lipid sentezi ile ilgili olarak, sterol ve trigliserit metabolik yolları, karaciğerdeki BMAL1 hedefleri arasındadır (76). Çalışmalar, çekirdek moleküler saatin, lipid metabolizmasında yer alan genleri aktive ederek veya baskılayarak, ya doğrudan ya da diğer transkripsiyon faktörlerinin döngüsünü düzenleyerek lipid metabolik yollarını düzenlediğini göstermektedir (77). Yapılan çalışmalar saat işlevinin kaybının, anormal yağ depolaması ve lipid taşınması, dolaşımdaki glukoz ve trigliserid

düzelelerinin değişmesi ve besinsel lipidlerin emilimindeki eksiklikler ile sonuçlandığını göstermiştir (75). Farklı araştırma grupları, sirkadiyen saat fonksiyonunun bozulmasının obezite ve metabolik hastalıklara yol açtđını göstermektedirler (77). CLOCK mutant fareler bozulmuş beslenme ritmi, hiperfaji, obezite, hiperlipidemi, hepatik steatoz ve hiperglisemiden oluşan bir metabolik sendrom geliştirmiştir (78). CLOCK mutant farelere benzer şekilde, BMAL1 knockout fareler de davranışsal olarak aritmiktir ve hiperlipidemi, karaciğer ve kasta ektopik yağ depolanması ve metabolik sendrom geliştirmiştir (79). Birlikte bu çalışmalar moleküler sirkadiyen saat için lipid homeostazını düzenlemede anahtar bir rol oynadığını göstermektedir (75).

Son zamanlarda çalışmalar, lipidomik çalışmaları, metabolitlerin (yani metabolomiklerin) geniş ölçekli profilinin çıkarılması için MS tabanlı yaklaşımlara ağırlık vermiştir (80). İnsan plazmasının lipidomik analizi, tüm lipid profillerinin yaklaşık %18'inin uyku ve gıda alımından bağımsız olarak sirkadiyen bir şekilde salındđını göstermiştir. Ritmisite gösteren metabolitlerin çoğu gliserolipidler (trigliserid ve digliseridler) ve az sayıdaki özellikle plazmalojen formundaki PC'ler olduğu bulunmuştur. İnsan kan numunelerinde fosfatidil gliserol (18:1) ve lizoPC (16:0)'in osilasyon gösterdiği tespit edilmiştir (75). İnsan plazmasında gerçekleştirilen sirkadiyen metabolomun kısmi profili, osilasyon gösteren metabolitlerin yüksek bir oranının (>%75) lipidler ve özellikle de yağ asitleri olduğunu ortaya çıkarmıştır (81). Diğer bir insan plazma metabolomik incelemesinde sirkadiyen varyasyon gösteren metabolitlerin çoğunluğunu açilkarnitinler, PC ve lizofosfolipidlerin oluşturduğu tespit edilmiştir (15). Ayrıca gliserofosfolipid ve sfingolipidlerin ritmik salınımlı metabolitler arasında olduğu fakat bu lipidlerin çoğu zamanlamasının bireyler arasında güçlü farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir (82). Bir hayvan çalışmasında ise fare karaciğerinde tespit edilen 587 salınımlı lipid molekülünün, gliserolipidleri (%62), gliserofosfolipidleri (%32) ve daha az ölçüde sfingolipidleri, sterol lipidleri ve yağ asitlerini içerdiği bildirilmiştir. Lipid sınıfları içerisinde, salınımların en sık triaçilgliserol (TG) (%57), ardından PI (%5,8), PC (%5,5) ve PE (%3,9) olduğu belirtilmektedir (83).

İnsan iskelet kasında yapılan lipidomik çalışmaları gliserolipidler, gliserofosfolipidler ve sfingolipidlerin diurnal osilasyon gösterdiğini tespit etmiştir. Bu da kas lipid metabolizmasında yaygın sirkadiyen etki olduğunu düşündürmektedir. Plazma membranının dış katmanında yoğunlukla bulunan lipidler in vivo ve in vitro

olarak oldukça koordineli bir şekilde osilasyon göstermektedir. Lipid metabolit osilasyonları sirkadiyen saat bozulduğunda belirgin şekilde azalmıştır. Belli başlı fosfolipidler ve sfingolipidler BMAL1 gen ekspresyonu ile korelasyon göstermiştir. CLOCK knockdown durumunda osilasyon gösteren lipid metabolitlerinin önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir. Bu fosfolipidler plazma membranının dış katmanının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle bu veriler, sirkadiyen saatin plazma membranının fonksiyonunu etkileyebileceğini ve bunun sonucunda reseptör sinyalizasyonunda ve membran glukoz alımında önemli etkilerinin olabileceğine işaret etmektedir (18).

Uyku kısıtlamasının metabolik işlevlerde aksamalara neden olmasının altında yatan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. Fakat uyku kısıtlamasının sirkadiyen biyoloji üzerindeki etkisi, insanlarda metabolitlerin sirkadiyen salınımının son zamanlarda gösterilmesiyle önemli olduğu anlaşılmıştır. Uyku süresinin kronik olarak kısıtlanması ve sirkadiyen saat bozulması; kilo alımı, obezite, metabolik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (75).

Uyku kısıtlatmalı koşullarda insan ve ratlarda kandaki iki metabolitin, oksalik asit ve diaçilgliserol (36:3)'ün önemli oranda azaldığı, uyku kısıtlamasının olmadığı zamanlarda ise normal düzeylere geldiği gözlenmiştir. Ayrıca her iki türde de fosfolipidlerin yükseldiği en çok yükselenlerin ise PC, lizoPC, PE ve SM olduğu belirtilmiştir. Yüksek düzeyde fosfolipid seviyelerinin kaynağı olarak membran parçalanması veya dolaşımdaki lipoprotein partiküllerinden salınma ihtimali üzerinde durulmuştur. Kandaki yüksek lizoPC'lerin ise muhtemelen lipoprotein PC'ye etki eden sPLA₂'den, karaciğerde düşük dansiteli lipoprotein (LDL) veya HDL'ye etki eden LCAT'dan veya HDL'ye etki eden EL'den kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. İlave olarak, HDL ve membran fosfolipid kompozisyonundaki değişimde PLTP ve sPLA₂ aktivitelerinin de etkili olması mevcut bilgiler ışığında olasıdır (14).

İnsanlarda uyku kısıtlaması sonucunda plazma metabolitlerinden özellikle lipidlerin ve açıl karnitinlerin etkilendiği bildirilmiştir. 13 gliserofosfolipid (PC'ler ve lizo türevleri) ve 3 sfingolipid düzenli uyku durumuna göre istatistiksel olarak anlamlı artışlar sergilemiştir. Çoğu plazma metabolitlerinde açık bir günlük ritim görülürken 24 saatlik uyanık kalma sonucunda bu ritimlerin amplitüdlerinde bir azalma görülmüştür (84). Uyku kısıtlaması sonucunda kandaki düzeyleri değiştiği bildirilen fosfolipidlerin

çoğunun sirkadiyen kontrol altında olduğu, diüurnal varyasyon gösterdikleri anlaşılmaktadır.

Bir hafta boyunca uyku kısıtlaması yapılmış insanların kanında yapılan transkriptom analizleri 711 genin aktivitesinin arttığı veya azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca yetersiz uyku sirkadiyen ekspresyon profiline sahip genlerin sayısını ve amplitüdlerini düşürmüştür. Yetersiz uykudan etkilenen genler arasında sirkadiyen ritim (PER1, PER2, PER3, CRY2, CLOCK), uyku homeostazisi, oksidatif stres ve metabolizma ile ilgili genler bulunmaktadır. Bu son grup içerisinde ABCA1 (ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcı protein A1) geni de bulunmaktadır. Bu protein, kolesterolü ve fosfolipidleri hücre içinden hücre dışına, HDL'ye transfer etmektedir. Etkilenen biyolojik süreçler kromatin modifikasyonu, gen ekspresyonu regülasyonu, makromoleküler metabolizma ve inflamatuvar, immun yanıtlar ve stres tepkileridir (85).

Sirkadiyen saat fonksiyonunun bozulması, olumsuz kardiyometabolik sonuçlarla ilişkili olmasına rağmen, sirkadiyen sistem tarafından düzenlenen metabolik yollardaki bireyler arası varyasyonlar hakkındaki bilgiler yetersizdir. Lipidomik analizlere göre salınım gösteren lipidlerin ritim zamanlaması arasında güçlü farklılıklar saptanmış olup, PC ve TG türlerinin gösterdikleri ritmisitenin gücüne göre denekler gruplandırılmıştır. Bu sonuçlar, genel populasyonda farklı sirkadiyen metabolik fenotiplerin varlığını göstermektedir. Birlikte bu veriler, lipid metabolizması bozuklukları ve sirkadiyen saat bozuklukları arasında potansiyel ilişkinin varlığına işaret etmektedir (75).

Fare plazmasında gerçekleştirilen LC-MS analizleri, sirkadiyen varyasyon gösteren 14 farklı lizoPC türü (18:1, 22:4, 22:6, 22:5, 20:4, 20:3, 20:2) tespit etmiştir (86). Bu fosfolipid metabolitlerin üretiminden sorumlu enzimler LCAT, sPLA₂ ve EL'dir (15). Bir fare modelinde LCAT, sPLA₂-XIIA ve EL enzimlerinin, karaciğerde ritmik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (17). Karaciğerdeki gen ekspresyon profili, ayrıca hepatik lipaz mRNA seviyelerinin de lizoPC sentezi ile uyumlu bir şekilde sirkadiyen ekspresyon gösterdiğini ortaya çıkarmıştır (87). Bu lizofosfolipid seviyelerindeki sirkadiyen varyasyonlar, lizoPC sentezinde yer alan anahtar enzimler olan, LCAT, sPLA₂ ve EL (17) ve hepatik lipazın (87) mRNA'larının karaciğerde osilasyon yapması ile kısmen açıklanabilmektedir. Birlikte bu veriler, metabolit-zaman çizelgesi yönteminin son zamanlarda hızla gelişen metabolomik tekniklere uygulanabileceğini ve insanlarda birçoğu tanımlanabilen osilasyon gösteren yüzlerce

saat kontrollü metabolitin ölçülebilmesini sağlayabilecektir. Sirkadiyen kan metabolomiklerine dayanarak, bir insanın genetik arka plan, cinsiyet, yaş ve beslenme farklılıklarına karşı sağlamlığını gösteren vücut zamanı ölçülebilir. İnsanların biyolojik saatinin kan örneklerinden başarılı bir şekilde tespiti, gelecekte sirkadiyen ritim bozukluklarının teşhisi, kronoterapi ve kişiye özel ilaç rejimlerinin potansiyel alanlarına önemli katkıları olacaktır (86).

Sirkadiyen ritim bozukluklarında serum fosfolipid kompozisyonunda görülen değişikliklerin mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik olarak üç etkileşim alanı seçilmiştir: Serum-HDL-eritrosit membranı

Serum: Sirkadiyen ritim bozukluklarından kaynaklanan fosfolipid sentez ve katabolizmasındaki değişimlerin sonuçları serum fosfolipid kompozisyonunun değerlendirilmesi ile ortaya koyulabilir. Serum bir fosfolipid havuzu olarak değerlendirilebilir. Gerek HDL ve gerekse eritrosit membranındaki fosfolipidlerin serum ile karşılıklı bir etkileşim halinde olduğu kabul edilmektedir (88,89). Bu etkileşimde büyük ölçüde PLTP, LCAT, EL ve sPLA₂ proteinlerinin etkili olabileceği düşünülmektedir.

HDL: HDL fosfolipitten en zengin lipoprotein fraksiyonudur. Ters kolesterol transportundan sorumludur. Çevre dokulardan aldığı fazla kolesterolü karaciğere taşıyarak, safra yoluyla vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. LCAT enzimi dolaşımında HDL'ye bağlıdır. Hücre membranlarından alınan fazla kolesterol bu enzimin aktivitesi sonucu kolesterol esterine dönüştürülür. Bunun sonucunda HDL çift katlı fosfolipid tabakasındaki PC'den LizoPC üretilir ve seruma verilir. Dolayısıyla serum fosfolipid kompozisyonunda etkilidir. Böylece sirkadiyen ritim bozukluklarının HDL fosfolipid kompozisyonu ve HDL'ye bağlı LCAT aktivitesi üzerindeki etkisi takip edilebilir (90).

Plazma HDL₂ konsantrasyonu ile aterosklerozis riski arasında ters bir korelasyonun olduğu bilinmektedir (90). HDL'nin antiaterojenik özelliği sadece ters kolesterol transportunda oynadığı rolden ibaret değildir. HDL lipoproteinleri aynı zamanda antioksidan özelliğe sahiptir. HDL ile birlikte taşınan apo A-I, A-II ve paraoksonaz antioksidan özellik göstermektedir. Bunun sonucunda LDL'nin oksidatif modifikasyonunu inhibe etmekte ve LDL'in aterojenik etkisini azaltmaktadır. HDL aynı zamanda antiinflamatuvar özelliklere de sahiptir. Endotelial hücrelerde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu inhibe etmektedir. Böylece kanda monositlerin arteriyel

duvara tutunmalarını azaltmaktadır. HDL'nin bu antioksidan ve antiinflamatuvar özellikleri aterosklerozisin önlenmesinde ters kolesterol transportundaki rolü kadar önemli olabilir (91). HDL partiküllerinin tüm bu antiaterojenik özellikleri dikkate alındığında, sirkadiyen ritim bozukluklarının aterogenezis riski ile bağlantısının değerlendirilebilmesi mümkün olabilir (90).

Eritrosit Membranı: Eritrositler oksijeni taşımaya daha elverişli bir hale gelmek için olgunlaştıklarında tüm organellerini kaybederler ve olgun halleri çekirdek, mitokondri, ribozom, vakuol ve endoplazmik retikulum içermez. Bu nedenle olgun eritrositler fosfolipid, TG, kolesterol ve yağ asidi de dahil *de novo* lipid sentezi yapamazlar. Bu sistem protein sentezi ve nükleik asit metabolizması olmadığı için sirkadiyen ritim araştırmaları için avantajlı bir membran modeli olabilir. Eritrosit membran kompozisyonundaki sirkadiyen ritim bozukluğuna bağlı değişimler büyük ölçüde serum ve HDL ile temasından kaynaklanan lipid değişiminden ileri gelecektir.

İnsan eritrositlerinin bazı enzimlerin aktivitesinde sirkadiyen ritim gösterdikleri belirtilmiştir. Eritrositler çekirdek, mitokondri, ribozom, vakuol ve endoplazmik retikulum içermeyen sitoplazmik kompartmanlardır. Bu sistem protein sentezi ve nükleik asit metabolizması olmadığı için sirkadiyen ritim için membran modelinde önemli olabileceği belirtilmiştir (92). Plazma ve eritrosit arasında fosfolipid değişimi (PC, SM) mevcuttur. Beslenme, yaşam şekli ve bazı hastalıkların (Alzheimer) serum ve eritrosit membranı arasında fosfolipid değişimini etkilediği bildirilmiştir (93,94).

İnsan ve rat eritrosit membranlarının dış katmanının fosfolipid kompozisyonu plazma fosfolipid kompozisyonunu yansıtmaktadır. Olgun eritrositlerde fosfolipidlerin yenilenmesindeki en önemli yollardan biri, serum lipoproteinleri ile eritrositler arasındaki fosfolipid değiş-tokuşudur. Bu değiş-tokuşun eritrosit membranının dış tabakasında cereyan ettiği düşünülmektedir (89). Çocuklarda eritrosit membran lipid kompozisyonunda sirkadiyen ritim bozukluğuna bağlı olarak eritrosit membran fosfolipid yağ asidi (n-3 PUFA'lar) kompozisyonunda uyku kısıtlamaları ile bağlantılı değişimler bildirilmiştir (95).

2.5. Fosfolipid Transfer Proteini

PLTP, bir lipid transfer proteinleri ailesine aittir. Bu ailenin üyeleri arasında bakteri öldürücü / geçirgenliği artıran protein (BPI) , kolesterol ester transfer proteini

(CETP) ve lipopolisakkarit (LPS) bağlayıcı protein (LBP) bulunur (96). Gen yapısındaki benzerlik ve kodlama dizilerindeki homoloji, bu gen ailesinin üyelerinin fonksiyonel olarak ilişkili olduğunu ve ortak bir ata genden evrimleştiklerini göstermektedir. Aslında, tüm bu proteinler, LPS ve fosfolipidleri bağlama ve transfer etme yeteneğine sahiptir (97). Genel olarak, bu transfer proteinlerinin her biri, lipid moleküllerinin taşınması için hidrofobik bir kanal oluşturmak üzere birbirine bağlanan N-terminal ve C-terminal fıçı yapıları ile bir bumerang şekline sahiptir. Diğer üç üyenin protein yapıları bilinmektedir, ancak PLTP'nin yapısı henüz aydınlatılamamıştır (96). BPI'nin kristal yapısına dayanan PLTP'nin üç boyutlu yapısal modeli, bir fosfolipid molekülünün açıl zincirlerini bağlamak için benzer katlanma ve her alanda hidrofobik bir cebe sahip iki alandan oluşan bumerang şeklindedir (97).

Hemen hemen test edilen tüm dokular PLTP'yi eksprese eder. Fizyolojik koşullar altında, plazma PLTP esas olarak plasenta, timus, yumurtalık, karaciğer, akciğer, yağ dokusu ve makrofajlar gibi dokulardan veya hücrelerden salınır, ancak insan plazmasındaki ana kaynağı hala bilinmemektedir (96). Fakat yapılan hayvan deneylerinden elde edilen verilere göre plazma PLTP aktivitesine katkılar yaklaşık olarak şu şekildedir: Hepatik PLTP % 20, hematopoetik hücreler % 40-50, Adiposit % 15, kahverengi yağ doku % 58, akciğerler % 15 (98). PLTP ayrıca insan aterosklerotik lezyonlarında da yüksek oranda eksprese edilir (96). İnsan genetik PLTP eksikliği henüz kesin olarak tanımlanmamıştır ve PLTP polimorfizmlerinin lipoprotein metabolizması üzerindeki etkisi açıkça belirtilmemiştir (99).

PLTP; lipoproteinler arasında fosfolipidler, diaçilgliserol, serebrositler, tokoferoller, sfingozin-1-fosfat (S1P) ve lipopolisakkaritler dahil olmak üzere farklı lipidleri etkili bir şekilde transfer eder ve trigliseritten zengin lipoproteinlere doğru kolesteril ester transferini teşvik edebilir (20). Lipid transfer aktivitesi açısından PLTP'nin kendine has özellikleri vardır. Nötr lipit transfer aktivitesi yoktur. PLTP, HDL'ye bağlı olarak dolaşır ve fosfolipidlerin tek katmanlı veziküller arasında HDL'ye net transferine ve ayrıca lipoproteinler arasında fosfolipidlerin değişimine aracılık eder (19).

PLTP, E vitaminini lipoproteinlerle ve lipoprotein-hücre arasında transfer edebilir. Dokularda E vitamini düzeylerinin korunması için PLTP aktivitesi önemlidir. Birçok sonuç, PLTP'nin dokulardaki işlevinin dolaşımdaki rolünden farklı

olduğunu öne sürdü. Hem hücre içi hem hücre dışı fonksiyon göstermektedir. PLTP eksikliği olan makrofajların, LDL varlığında çok fazla kolesterol biriktirdiği ve E vitamini takviyesinin, makrofajlardaki kolesterol seviyelerini normaleştirdiği bulunmuştur. PLTP eksikliği olan hepatositlerin daha az ApoB içeren lipoprotein salgıladığı ve bunun, vitamin E-eksikliği aracılı oksidatif stresin ApoB içeren lipoproteinlerin erken yıkımına yol açtığı bulunmuştur. Bu nedenle, hücre içi PLTP'nin etkileri, hücresele E vitamini seviyelerindeki değişiklikler ve oksidatif stres ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (100). PLTP eksikliği, *in vivo* azalan beyin dokusu α -tokoferol seviyeleri ve artan anksiyete semptomlarıyla ilişkilendirilmektedir. İlginç bir şekilde, plazma PLTP lipid transfer aktivitesini önemli ölçüde azaltan PLTP genindeki bir mutasyon, insanlarda beyin E vitamini seviyelerinin azalmasına bağlı ataksi ile ilişkilendirilmiştir. PLTP *in vivo* beyin E vitamini içeriğinin major düzenleyicilerinden biri olabilir (97).

2.5.1. PLTP Formları

İnsan plazmasında aktif PLTP ve inaktif PLTP olmak üzere iki formu vardır, ilki apoA-I ile komplekslenir ve ikincisi apoE ile komplekslenir (96). Aktif PLTP varlığında HDL inkübasyonunun preB-HDL oluşumuyla sonuçlandığı ve buna doğru makrofaj kolesterol akışında % 42 artışa neden olduğu, inaktif PLTP'nin ise ne preB-HDL oluşturduğu ne de kolesterol çıkışını artırdığı araştırmalarla tespit edilmiştir (19). İnaktif PLTP'nin fizyolojik işlevi şu anda bilinmemektedir. *In vitro* çalışmalar, hücrelerin sadece aktif PLTP salgıladığını göstermektedir. Böylece, lipidler apoB içeren lipoproteinlerden veya hücrelerden HDL parçacıklarına aktarılırken inaktif PLTP oluşur. Bu hipotezlere dayanarak, inaktif PLTP, havuz boyutu hücresele ve vasküler proteinler ve lipoproteinler tarafından düzenlenen bir PLTP rezervuarı görevi görür ve gerektiğinde hızla aktif PLTP'ye dönüştürülebilir. Plazma aktif ve inaktif PLTP komplekslerinin karşılıklı dönüşümünü daha iyi belgelemek ve bu dönüşümleri düzenleyen faktörleri belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (97).

2.5.2. PLTP Konsantrasyonunun ve Aktivitesinin Regülasyonu

PLTP ifadesi, peroksizome proliferatör-aktive reseptör-gama bağımlıdır; yani, steroller, glukoz, fibratlar ve kenodeoksikolik asit gibi peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptörler tipi gama agonistleri tarafından uyarılır (98). İnsan ve fare PLTP promotörleri, karaciğer X reseptörü yanıt elemanlarını içerir ve karaciğer X

reseptörü tarafından düzenlenebilir (96). Aynı faktörler, ABCA1 ekspresyonunu ve hücrelerden fosfolipid akışını düzenler. Yağ bakımından zengin ve yüksek düzeyde glukoz içeren bir diyet, PLTP gen transkripsiyon oranını ve proteinin aktivitesini artırır. Fibratlar ile tedavi edilen hastalarda benzer bir etki meydana gelmiştir. Ayrıca, insan apolipoproteinleri apoA-I, apoA-II ve apoE, PLTP aktivitesini artırırken, yükselen insülin seviyeleri ters etkiyi tetiklemiştir. PLTP konsantrasyonu, bakteriyel enfeksiyon varlığı veya farelere LPS enjeksiyonundan sonra plazmada LPS konsantrasyonundaki artış nedeniyle azalmıştır. Aynı zamanda, aktif inflamasyonun PLTP konsantrasyonunda bir artışa neden olduğu ve konsantrasyonunun C-reaktif protein seviyesi ile korelasyon gösterdiği birçok raporda belirtilmiştir (98). Artmış PLTP'nin, inflamatuvar stres koşulları altında membran bütünlüğünü korumak için hücrelere daha fazla fosfolipid transferini sağlayabileceği öne sürülmüştür (97).

PLTP seviyesi ayrıca yaş, vücut kitle indeksi (VKİ) ve trigliserid seviyesi ile de artmıştır (98). Yapılan birkaç çalışmada plazma PLTP aktivitesinde cinsiyet farklılıkları gözlenmemiştir (97). Birçok fizyolojik faktör ve patolojik uyarıcı da PLTP aktivitesinin ekspresyonunu düzenleyebilir. Hipoksi ve safra asidi PLTP ekspresyonunun upregülasyonunu uyarabilir. Diaçilgliserol PLTP aktivitesini de düzenleyebilir. Alveolar epitel hücrelerinde, oksitlenmiş LDL, TGF- β 1 / smad3 / Ras / ERk yolu aracılığıyla PLTP ekspresyonunu uyarabilir. Sigara dumanı özütü, TGF- β 1 / SiklinD1 / CDK4 yolu aracılığıyla PLTP ekspresyonunu indükleyebilir. Birçok çalışma, plazma PLTP aktivitesinin, plazma kolesterol, TG, apoB, VLDL (Çok düşük dansiteli lipoprotein) ve orta yoğunluklu lipoproteinlerle pozitif olarak ilişkili olduğunu göstermiştir ve hormonların ve hepatik trigliserid lipazın bu ilişkileri düzenleyebileceğine dair kanıtlar vardır (97).

2.5.3. PLTP ve HDL Regülasyonu

PLTP'nin fizyolojik veya patolojik rolü hala bilinmemektedir (20). HDL biyosentezi için dört yol vardır ve PLTP tüm bu süreçlerde rol oynar. PLTP, olgun HDL oluşumu için lipidleri, fosfolipidleri ve serbest kolesterolü VLDL veya şilomikron yüzeyinden yeni oluşan HDL'ye aktarabilir. PLTP'den yoksun farelerde HDL'nin dramatik azalması, VLDL sekresyonunun azalması ve VLDL'den HDL'ye blokaj lipid transferiyle ilişkili olmalıdır. Dahası, PLTP eksikliği, HDL devir oranını önemli ölçüde artırır. Hepatositlerin, enterositlerin ve periferik doku hücrelerinin (makrofajlar)

ABCA1 aracılığıyla HDL oluşumuna katkı sağladığı iyi bilinmektedir. PLTP, ABCA1'in lipidlerin dışarı akmasına yardımcı olabileceğinden, PLTP aktivitesinin bu üç tip hücrede HDL üretiminde bir etkisi olmalıdır. PLTP ayrıca daha büyük HDL yapmak için varsayılan bir füzyon faktörüdür. Ayrıca PLTP, lipoproteinler arasında fosfolipitleri de değiştirir. Yapılan bir çalışmada insan PLTP transgenik farelerinde, plazma toplam HDL seviyesi önemli ölçüde azalmış ve plazma pre β -HDL seviyesi önemli ölçüde indüklenmiştir (101). PLTP aktivitesi HDL partikül boyutunu, inflamatuvar indeksi ve kolesterol / fosfolipid kompozisyonunu etkiler (100).

Genel olarak, PLTP eksikliği, plazma HDL-K seviyelerinde önemli bir azalmaya neden olur. İlginç bir şekilde, hem PLTP aşırı ekspresyonu hem de eksikliği, HDL azalmasına neden olur ve nedeni hala bilinmemektedir (96). Şimdiye kadar insanlarda PLTP eksikliği bulunmamıştır (19).

2.5.4. PLTP ve VLDL Sekresyonu

VLDL sekresyonu, aşırı beslenme veya metabolik sendromda meydana gelen aşırı karaciğer TG birikimine karşı hepatik spesifik bir savunmadır. PLTP, VLDL üretiminde önemli bir rol oynar. İnsan genomu çalışmaları, plazma PLTP seviyelerinin plazma apoB ve TG seviyeleri ile pozitif olarak ilişkili olduğunu göstermiştir. Farelerde PLTP eksikliği, karaciğerden VLDL sekresyonunu azaltırken, PLTP aşırı ekspresyonu VLDL aşırı üretimini teşvik eder. PLTP aktivitesinin indüksiyonu, TG'nin VLDL'ye dahil olmasına izin verir. Önemli olarak PLTP, fare primer hepatositlerinde VLDL birleşmesinin başlamasında önemli bir rol oynar. İnsan PLTP transgenik tavşanları, daha fazla VLDL üretimi ile ilişkili olabilecek plazma LDL'sinde önemli bir artışa sahiptir (Tavşan ve insan LDL memelileri olduğundan bu gözlem insanlardaki durumu yansıtabilir). Farelerde ve insanlarda yağlı karaciğere neden olan mikrozomal trigliserid transfer protein inhibisyonunun aksine, PLTP eksikliği olan farelerde karaciğerde lipid birikimi yoktur, bu nedenle potansiyel olarak, insanlarda PLTP inhibisyonu, karaciğer yağlanması olmaksızın VLDL ve LDL'nin azalmasına neden olabileceği bildirilmiştir (96).

2.5.5. PLTP ve Tromboz

PLTP eksikliği olan fareler, kontrollere göre daha uzun bir kan pıhtılaşma süresine sahiptir. Bu gözlem, kırmızı kan hücrelerinde E vitamini azalması yoluyla fosfatidilserin (PS) eksternalizasyonundaki bir azalma ile ilişkilidir. Ayrıca, PLTP'nin

trombositlerin plazma membranı üzerinde bir flippaz olarak PS eksternalizasyonunu uyarabildiği ve kollajen ve ADP aracılı platelet agregasyonunu hızlandırdığı bulunmuştur (102). Bu nedenle PLTP, hiperkoagülasyonla ilişkili gibi görünmektedir.

2.5.6. PLTP ve İnflamasyon

PLTP ve inflamasyon arasındaki ilişki tartışmalıdır. PLTP eksikliği olan fareler dolaşımdaki interlökin-6'yı azaltır (96). Bazı araştırmacılara göre, PLTP, kolesterolün taşınmasında olduğu gibi, LPS'nin ters taşınmasında rol oynayabilir ve LPS'nin safra atılımı ile eliminasyon oranını artırabilir (103). Diğer bir gruba göre ise, PLTP, LPS'nin HDL'ye bağlanmasında anahtar bir aracı olabilir. LPS'nin PLTP varlığında HDL ile inkübasyonu partiküllerin bağlanmasına yol açar (104).

PLTP'nin, LPS'nin neden olduğu inflamasyonu *in vivo* ve *in vitro* olarak LPS nötralizasyon kapasitesi yoluyla bastırmak için temel bir akut faz proteini görevi gördüğünü iddia eden çalışmalar da vardır (105). Çalışmalar, sepsisli hastalarda PLTP aktivitesinin azalmış seviyelerinin kötü bir prognostik faktör olabileceğini göstermektedir. Artan PLTP aktivitesi seviyeleri, septik şokun önlenmesi ve tedavisinde faydalı olabilir (98).

2.5.7. PLTP ve Ateroskleroz

Yapılan kesitsel bir çalışmada, KKH hastalarında serum PLTP aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (106). Ayrıca, PLTP'yi işaretleyen iki tek nükleotid polimorfizmi olan PLTP gen varyasyonunun (azalmış aktivite), 5 kohort arasında azalmış kardiyovasküler hastalık riskine yol açtığı bildirilmiştir. Nispeten yeni bir Framingham Kalp Çalışması, daha yüksek plazma PLTP aktivitesinin, erkekler arasında ölümcül veya ölümcül olmayan KKH ve inme olarak tanımlanan ilk kardiyovasküler olayı öngördüğünü gösterdi (107). Plazma PLTP aktivite seviyelerinin 5 yıl içinde tüm nedenlere bağlı mortalitenin güçlü ve bağımsız bir belirteci olduğu ve daha yüksek PLTP aktivitesinin daha yüksek mortaliteye sahip olduğu şeklinde güncel bir bilgi elde edilmiştir (108). Obezite, insülin direnci ve T2DM gibi artan KKH riskleri ile ilişkili hastalıklarda da PLTP ekspresyonu artmıştır (109). Oysa ki başka bir çalışmada, toplam PLTP kütlesinde önemli bir değişiklik olmaksızın düşük PLTP aktivitesinin periferik ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu da bildirilmiştir (19).

Fare modellerinde ise, global PLTP eksikliği ateroskleroz gelişimini azaltırken, PLTP aşırı ekspresyonu ters bir etkiye sahiptir. Global PLTP eksikliği ayrıca trombotik yanıtta bir azalma ile ilişkilidir ve abdominal aort anevrizmalarının insidansını azaltır. Bir tavşan modelinde, aşırı PLTP ekspresyonu yüksek yağlı diyetten sonra ateroskleroz oluşumunu artırır. Genel olarak PLTP, hayvan modellerinde kanıtlanmış bir ateroskleroz risk faktörüdür (96). Yapılan bir hayvan çalışmasında, PLTP eksikliğinin diyetle indüklenen obeziteyi ve insülin reseptörü-Akt-glukoz transporter 4 (GLUT4) yoluyla insülin direncini önlediğine ve PLTP -/- farelerde plazma membranlarında sfingomiyelin ve serbest kolesterol seviyelerinin azalmasına, insülin reseptörünün aktivasyonuna katkıda bulunabileceğine dair yeni bir paradigma bulundu.

2.5.8. PLTP ve Nörolojik Fonksiyonlar

PLTP beyinde ifade edilir ve nöronlar ve glial hücreler tarafından salgılanır, ancak işlevi hala tam olarak anlaşılammıştır. İnsan beyinde en az üç PLTP izoformunun olduğu ileri sürülmüştür. PLTP, hem beyin omurilik sıvısında (BOS) hem de beyin dokusunda fosfolipid transferinde mevcuttur ve aktiftir (110). Hayvan çalışmaları, koroid pleksus ve ependimada yüksek seviyelerde PLTP ekspresyonu göstermiştir, bu da BOS PLTP'nin büyük bir kısmının bu yapılar tarafından salgılandığını ve dolayısıyla BOS PLTP seviyelerine ve aktivitesine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (111). Beynin farklı bölgelerindeki PLTP seviyelerindeki önemli farklılıklar, çeşitli beyin bölgelerinde spesifik PLTP fonksiyonlarını göstermektedir. İmmünohistokimyasal veriler, PLTP'nin insan beyindeki miyelinli lifler boyunca biriktiğini göstermiştir, bu da miyelinin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün korunmasında rol oynayabileceğini düşündürmektedir. İlginç bir şekilde, beyindeki PLTP ekspresyonu özellikle beyin gelişimi sırasında yüksektir ve bu kanıt beyin miyelinasyonu ile ilgisini daha da destekler (97).

Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda sağlıklı kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha düşük BOS PLTP aktivitesi bulunmuştur (97) ve PLTP eksikliğinin, β -amiloid ile ilişkili hafıza eksikliklerini şiddetlendirebileceği öne sürülmüştür (96). Multipl skleroz gibi aktif nöroinflamatuvar hastalıklarda BOS PLTP aktivitesi önemli ölçüde azalır ve inflamatuvar süreç inaktif hale geldikçe artar. Bu nedenle, multipl sklerozlu hastalarda BOS PLTP aktivitesinin, remiyelinizasyon için hassas bir marker

olabileceği düşünülmektedir (97). PLTP'nin beyindeki fizyolojik ve patolojik etkileri hala çözülmekten uzaktır.

2.5.9. PLTP ve Kanser

PLTP'nin; akut ve kronik lösemi, glioblastoma, pleomorfik liposarkom, adenomlar, akciğer, prostat, meme ve diğer kanserlerde serumdaki aktivitesinin değişkenlik gösterdiği bulunmuş ve PLTP'yi kodlayan kromozomda, 20q12-13.1 bölgesi, lösemi ve diğer kanserler ile ilişkilendirilmiştir (97). Ek olarak, PLTP konsantrasyonunun meme kanseri olan hastalarda sağkalım için prognostik bir faktör olabileceği gösterilmiştir. Kanserli hastalarda serum PLTP düzeylerindeki farklılıklar, PLTP'nin neoplastik süreçte önemli bir düzenleyici faktör olabileceğini ortaya koymaktadır (98).

2.6. Lesitin: Kolesterol Açıltransferaz

Lesitin: kolesterol açıltransferaz (LCAT: EC 2.3.1.43), esas olarak karaciğerde üretilen ancak aynı zamanda merkezi sinir sisteminde sentezlenen yaklaşık 67 kDa büyüklüğünde bir sekretuar proteindir. Çoğunluğu HDL'ye ve daha düşük bir derecede düşük yoğunluklu lipoproteinlere (LDL) bağlanır. Kolesterolü esterleştirdiği bilinen üç enzimden biridir; diğer ikisi hücre içi açıl-kolesterol transferaz enzimleridir (112). LCAT, serbest kolesterol ve PC'den kolesteril ester oluşumunu katalize edebilen tek plazma enzimidir (113). LCAT reaksiyonu, plazmada dolaşan kolesteril esterinin çoğundan sorumludur. Plazma kolesterolünün yaklaşık üçte ikisi (yaklaşık % 70) serbest yağ asidi ile esterlenir (20). LCAT, kolesterolü esterleştirme kabiliyetini açıklayan iki farklı katalitik aktiviteye sahiptir. İlki bir fosfolipaz A₂ aktivitesi, yağ asitlerini PC ve diğer fosfolipidlerin sn-2 konumundan ayırır. İkincisi, bölünmüş yağ asidini kolesterolün A halkasındaki hidroksil grubuna aktaran bir transesterifikasyon aktivitesine sahiptir (112).

Plazma kolesteril esteri oluşumu, HDL'lerin olgunlaşması ve ters kolesterol transportunda kritik bir adımdır; periferik dokulardaki fazla hücrel kolesterolün atılmak üzere karaciğere taşındığı bir süreçtir. LCAT, lipit / su arayüzünde etki eder; ancak Apo A-1 varlığında reaktivitesi 300 kata kadar çıkmaktadır (113). LCAT için en iyi substrat HDL, özellikle de HDL'nin diskoid formudur. ApoA-I güçlü bir aktivatördür, ancak tek değildir. LCAT ayrıca apoA-IV, apoE ve bir dereceye kadar apoC ile aktive edilebilir. ApoA-II ile etkinleştirilemez (20) , bunlar büyük olasılıkla

substratlarının, yani fosfolipidlerin ve kolesterolün lipoproteinlerin yüzeyindeki sunumunu değiştirerek LCAT'yi aktive eder (112). Diskoid HDL, periferik hücrelerden (veya diğer lipoproteinlerden) daha fazla kolesterol alabilir ve daha fazla kolesterol, LCAT ile daha fazla esterlenir. Kolesteril esteri, TG'den daha az çözünürdür; dolayısıyla, parçacığın yüzeyinden çekirdeğine göç ederler. Bu göç, diskoidalden küresel formdaki HDL partikülüne dönüşüme neden olur (20).

Plazmadaki kolesterol esterifikasyon reaksiyonu, LCAT aktivitesi, yani plazmadaki aktif LCAT miktarı ve plazma TG konsantrasyonu tarafından belirlenir (99).

LCAT, lipoprotein metabolizması üzerinde iki ana etkiye sahiptir. Birincisi, kolesteril esterler, serbest kolesterolden daha hidrofobik olduğundan, LCAT tarafından oluşturulan kolesteril esterler, lipoproteinlerin yüzeyinden hidrofobik çekirdeğe ilerler. Bu, küçük pre- β HDL'yi (yeni oluşan, diskoid şekilli HDL), plazmada bulunan daha büyük, küresel şekilli α -HDL formlarına dönüştürür. HDL boyutundaki artış, renal klirens ile uzaklaştırılmasını önler. LCAT'nin ikinci ana etkisi, kolesterolün esterleştirilmesinin, pasif difüzyon yoluyla HDL'den periferik hücrelere geri kaçışını engellemesidir ve bu nedenle, kolesterolün periferik hücrelerden HDL'ye net bir şekilde aktarılmasını teşvik ettiğine inanılmaktadır (112). LCAT'in, aşırı kolesterolün hücrelerden bu şekilde HDL ile uzaklaştırıldığı ve boşaltım için karaciğere verildiği anti-aterojenik bir süreç olan ters kolesterol transportunu teşvik eden önemli bir oyuncudur (114).

LCAT eksikliği insanlarda iki farklı klinik sendromla karşımıza çıkmaktadır:

- 1- Balık gözü hastalığı
- 2- Ailesel LCAT eksikliği

Balık gözü hastalığında, hastalar plazmada kısmi LCAT aktivitesine sahiptir ve nispeten asemptomatiktir. Bu hastalar genellikle düşük HDL-K (tipik olarak <10 mg / dL) ve serbest kolesterol birikimi nedeniyle korneal opasiteler ile başvurur. Neredeyse tam plazma LCAT aktivitesi eksikliği olan Ailesel LCAT eksikliği olan hastalar, kornea opasitelerine ve düşük HDL-K'ye ek olarak; hipertansiyon, hepatosplenomegali ve normokromik normositik anemi geliştirir. Bu hastalarda morbidite ve mortalitenin ana nedeni, adölesan dönemde proteinüri olarak başlayan ve yaşamın dördüncü veya beşinci

dekadında son dönem böbrek hastalığına ilerleyen böbrek hastalığıdır. Glomerulusta Lp-X benzeri partikül birikiminin böbrek hastalığının gelişiminin arkasındaki ana mekanizma olduğuna inanılmaktadır. Düşük HDL-K seviyelerine rağmen, Balık gözü hastalığı veya Ailesel LCAT eksikliği hastalarının belirgin bir kardiyovasküler hastalık riskine sahip görünmemektedir. Bu durum LCAT'nin rolü hakkındaki soruları gündeme getirmektedir (112). Artmış bir LCAT aktivitesinin aterosklerozun ilerlemesi ile ilişkili olması oldukça muhtemel görünmektedir. Ayrıca, birkaç araştırma, TG'den zengin lipoproteinlerin serum seviyelerindeki artış ile LCAT aktivitesinin yükselmesi arasında pozitif bir korelasyonun varlığını da ileri sürmüştür (115–117).

LCAT, yağ asitlerini gliserofosfolipidlerden kolesterole aktararak işlevini yerine getirirken lizofosfolipidlerin salınmasına katkıda bulunur. Bu biyolojik olarak aktif moleküller, iltihaplanma, apoptoz, üreme, bağışıklık, karsinogenez, anjiyojenez ve metabolik hastalıkların düzenlenmesi gibi geniş bir fizyolojik ve patolojik süreç yelpazesinde yer alır. Bu moleküllerden bazıları, insanlarda diyabet, ateroskleroz, obezite ve farklı kanser türleri biyobelirteçleri olarak önerilmiştir (118). Serum LCAT aktivitesi, her ikisi de metabolik sendrom ve diabetes mellitus ile ilişkili olan serum yüksek TG ve düşük HDL-K konsantrasyonları olan hastalarda yükselir. Bu nedenle artan serum kolesterol esterifikasyon oranı, gelecekteki diabetes mellitus için güçlü bir belirleyicidir (119). Bununla birlikte, daha önce, serum kolesterol esterleşme oranları olarak ölçülen artmış serum LCAT aktivitesinin, genel bir popülasyonda gelecekteki KKH riski ve ani ölüm ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (120). Ayrıca, serum LCAT aktivitesinin bel çevresi artışı, serum TG konsantrasyonu artışı ve serum HDL-K konsantrasyonu azalışı ile yüksek oranda ilişkili olduğu gözlemlenmiştir ve bunların hepsi metabolik sendromun bileşenleri ve insülin direnci ile ilişkili durumlardır (121). Önceki bazı çalışmalarda da benzer sonuçlar bulunmuştur (116,121–124).

Birlikte ele alındığında, hipertrigliseridemi, LCAT'ye bağlı yollar aracılığıyla insülin direncine neden olabilir. Ek olarak, LCAT tarafından üretilen lizoPC'nin de insülin sinyalini bozduğu gösterilmiştir. LizoPC'nin bu zararlı etkileri diabetes mellitus gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca artan plazma serbest yağ asidi seviyeleri, insülin direncinin bir nedenidir. Şu anda yapılabilecek nispeten güvenli çıkarım, LCAT'nin ateroskleroz gelişimi üzerindeki genel koruyucu etkisinin muhtemelen küçük olduğudur. Ayrıca, LCAT reaksiyonunun bir ürününün, yani lipoproteinlerin

aterojenitesini artıran lizoPC'nin, LCAT'nin ters kolesterol transportu yolu üzerindeki yararlı etkilerini hafifletebileceği öne sürülmüştür. LCAT, HDL metabolizmasında anahtar bir enzimdir ve muhtemelen ters kolesterol transportunu güçlendirir ancak insan aterosklerozundaki rolü kesin olarak belirlenmemiştir (112).

2.7. Endotelyal Lipaz

Yağ asitlerinin hücreye girmesi için dolaşımdaki lipoproteinlerin hidrolize edilmesi gerekir. Lipaz adı verilen hücre dışı enzimler, lipoproteinlere bağlanır ve hidrolizlerini katalizleyerek içeriklerini serbest bırakır. Serbest yağ asidi daha sonra doğrudan metabolik yollara girebilecekleri veya daha sonra lipid damlacıkları adı verilen hücre içi yapılarda kullanılmak üzere depolanabilecekleri hücreler tarafından alınır (125). Lipazlar, trigliseridler ve fosfolipidler gibi substratları hidrolize eden, benzer bir yapıya sahip olan ve lipoproteinlerin ve lipidlerin metabolizmasında gerekli olan suda çözünür enzimler ailesidir. Bu aile, pankreatik lipaz, hepatik lipaz ve lipoprotein lipazdan oluşmaktadır (126). 1999'da iki grup aynı anda dördüncü bir üye olarak endotelyal lipaz (EL)'yi keşfetti. Bu yeni enzim, esas olarak HDL-K plazma konsantrasyonlarının düzenlenmesine katılımı nedeniyle ateroskleroz süreciyle ilişkilendirilmiştir (22,127).

EL'nin tersiyer yapısı henüz keşfedilmemiştir. Bununla birlikte, yakından ilişkili TG lipaz ailesi üyeleriyle EL'nin amino asit dizilerinde, LPL ile % 44, HL ile % 41 ve pankreatik lipaz ile % 27 oranında benzerlikler keşfedilmiştir (22,127). EL, primer olarak fosfolipaz aktivitesi ve buna ilaveten trigliserid lipaz aktivitesi vardır (22,127). Diğer lipazlardan farklı olarak EL, endotel hücreleri tarafından sentezlenir, ancak diğerleri gibi endotel hücrelerinin yüzeyine yer değiştirir (127). EL, endotel hücrelerinin yanı sıra karaciğer, akciğer, makrofaj, testis, yumurtalık ve plasentada da sentezlenmektedir (22). EL ayrıca hipokampusun piramidal hücrelerinde, üçüncü ventrikülün ventral kısmındaki ependimal hücrelerde ve bazı kortikal hücre katmanlarında da bulunur (128).

Şu anda EL'nin temel fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Lokalizasyonu, düzenlenmesi ve hücre içi ve hücre dışı formların varlığı hakkında bazı soru işaretleri mevcuttur. EL'nin, spesifik dokular ve hücreler için bir enerji kaynağı olarak serbest yağ asidi üretmek amacıyla lipoprotein fosfolipidlerini hidroliz ederek

fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (129). Örneğin, endotel hücreleri, proliferasyon ve inflamasyon sırasında enerji için EL tarafından üretilen yağ asitlerini kullanabilir (130). Ayrıca en yüksek mRNA düzeyine sahip olduğu tespit edilen tiroid bezi, yüksek bir metabolizma hızına ve yüksek bir kan akışına sahiptir. Sürekli aktif olduğundan ve yağ asitlerini depolamanın bir yolu olmadığından, yemekler arası dönemlerde bile kanda her zaman bol olan lipoprotein ile ilişkili fosfolipidlerin yağ asitlerini kullanabilir (22). Benzer şekilde, sürekli olarak sürfaktan sentezlemesi gereken akciğer, önemli bir depolama kapasitesine sahip olmadığından, yağ asitlerine, gliserolipidlere ve fosfolipidlere sürekli bir ihtiyaç duymaktadır. Böylece EL, akciğere hem enerji hem de yüzey aktif madde bileşenleri kaynağı sağlayabilir (131).

2.7.1. Endotelyal Lipaz ve HDL-K Regülasyonu

Serum HDL-K seviyeleri kısmen lipaz enzim ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. EL, aşırı eksprese edildiğinde, plazma HDL-K seviyelerinde önemli bir azalma olmuştur (127). Tersine, EL knockout fareler, HDL-K seviyelerinde belirgin bir yükselme göstermiştir. Bu veriler, EL'nin HDL metabolizmasında fizyolojik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (130). HDL'nin EL'nin tercih edilen substratı olduğu, ancak EL'nin apo B içeren lipoproteinleri (VLDL/LDL) de hidrolize edebildiği görülmüştür (132). Sonuç olarak EL, HDL partiküllerinin yeniden şekillenmesini ve ortadan kaldırılmasını indükler. EL, lipoprotein ve endotel hücreleri arasında köprü görevi görerek lipoprotein alımını uyarır (23).

EL'nin enzimatik aktivitesinden bağımsız olan katalitik olmayan fonksiyonlar sergilediği gösterilmiştir. Araştırmacılar, EL'nin HDL holopartiküllerinin bağlanmasını ve alımını kolaylaştırma kabiliyetini ve HepG2 hücrelerinde HDL-kolesterol esterlerinin seçici alımını göstermiştir (133). İn vitro çalışmaların verilerine göre EL ayrıca plazma lipoproteinleri içeren apo AI (yani HDL) ve apo B'nin (yani VLDL ve LDL) bağlanmasına ve alımına aracılık edebilir. Bu süreç, EL'ye bağlanan hücre zarı üzerindeki heparin sülfat proteoglikanlara (HSPG'ler) bağlıdır. Bu şekilde EL, plazma lipoproteinleri ve hücreler arasında köprü oluşturan bir molekül görevi görebilir (133).

2.7.2. EL Düzenleme Mekanizmaları

Olgun EL oluştuğunda, aktivitesi ve substrat özgüllüğü, lipoproteinlerde önemli bir fosfolipid olan SM tarafından yönetilir. Yapılan araştırmalar, SM'nin fizyolojik bir

EL inhibitörü olduğunu ortaya çıkarmıştır. SM'nin, lipoproteinlerin sn-1 pozisyonunda PC'nin EL hidrolizini inhibe ettiği gösterilmiştir (134). Çok sayıda çalışma, EL'nin lipidleri nasıl düzenlediğini incelemiştir, ancak çok azı lipidlerin EL ekspresyonunu ve inflamatuvar yanıtı nasıl düzenleyebileceğini göstermiştir. İnflamasyonda yağ asidi ve EL'nin rolünü araştıran araştırmacılar, doymuş yağ asidi palmitik asidin makrofajlarda ve fare modellerinde EL ekspresyonunu indükleyebildiğini, aykozapentaenoik asitin de, EL ekspresyonunu azalttığını bulmuştur (135). Diğer bir çalışmada ise ilk olarak EL mRNA konsantrasyonlarının, tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-1-beta gibi vasküler hastalıkta rol oynayan inflamatuvar sitokinler tarafından hücrelerde arttığı gösterilmiştir (129).

2.7.3. EL ve Ateroskleroz

Ateroskleroz, inflamatuvar bir süreçtir (136) ve sitokinlerin hastalığın ilerlemesi için gerekli diğer süreçleri destekleyen çeşitli genlerin ekspresyonunu başlatmada önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Bu konuda en çok dikkat çeken iki sitokin tümör nekroz faktörü- α ve interlökin-1 β 'dir. Bu nedenle, EL'nin endotel hücrelerinde bu sitokinler tarafından ekspresyonunun arttığı yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (22). EL'nin hücre kültürlerinde LDL ve şilomikron kalıntıları gibi proaterojenik lipoproteinlerin alımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir. Bu veriler, bu enzimin apoB içeren lipoproteinlerin plazma seviyelerini düşürmede bir rol oynayabileceğini ve dolayısıyla antiaterojenik etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, vasküler endotelial hücre yüzeyinde bulunan EL, arter duvarında LDL birikimini uyarabilir ve böylece aterojenez duyarlılığını artırabilir (23).

Makrofajlar, aterosklerozun gelişmesinde ve ilerlemesinde çok önemli bir rol oynar. EL, makrofajlar tarafından sentezlenen ve salgılanan birkaç lipazdan biridir. İnsan aterosklerotik plaklarında bulunan makrofajlarda yüksek seviyelerde EL ekspresyonu gözlemlenmiştir (137). Başlıca bir inflamatuvar uyaran olan LPS, lipoprotein metabolizmasında ve aterosklerozda önemli bir rol oynayabilir (138). Yapılan bir araştırmada EL ekspresyonunun LPS ile arttığı bildirilmiştir (139). Lipopolisakkarit ile indüklenen fare enflamasyon modellerinde, EL mRNA ve protein konsantrasyonları aort, akciğer, kalp, böbrek, karaciğer ve dalakta önemli ölçüde artmıştır (140). Bu, belki *de novo* anjiyogenezi destekleyerek ve endotel hücre

proliferasyonu ve göçü için gerekli enerji için yağ asidi sağlayarak, aterosklerotik sürece katılımını anlamak için çok önemli olabilir (141).

2.7.4. EL ve Metabolik Sendrom

Ulusal Kolesterol Eğitim Programı tarafından tanımlanan metabolik sendromlu bireylerde plazma EL konsantrasyonlarının, sağlıklı hastalarda ölçülen konsantrasyonlardan yaklaşık % 50 daha yüksek olduğu bulundu (142). Yapılan başka bir çalışmada ise plazma EL konsantrasyonu ile visseral yağ birikimi arasında güçlü bir korelasyon bulundu (143). Araştırmacılar, düşük HDL-K konsantrasyonu, yüksek TG serum konsantrasyonu, yüksek açlık glukozu, obezite ve hipertansiyon gibi bazı metabolik sendrom belirtilerinin yüksek plazma EL seviyeleri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (144). T2DM'li hastalarda ve kronik subklinik inflamasyonu olan hastalarda yüksek EL serum konsantrasyonları da görülmüştür (145). Bununla birlikte, ilginç bir şekilde, metabolik sendromlu erkekler arasında, sadece yüksek plazma C-reaktif protein konsantrasyonlarına sahip olanların, yüksek plazma EL konsantrasyonlarına sahip olduğu bulunmuştur. Birlikte ele alındığında, bu bulgular, metabolik sendromun birkaç özelliği ile plazma EL konsantrasyonları arasındaki korelasyonun, bunların iltihaplanma ile ortak ilişkisine bağlı olabileceğini düşündürmektedir (146).

2.7.5. EL ve Hipertansiyon

Metabolik sendromun bir başka önemli bileşeni olan hipertansiyon ile EL arasında doğrudan bir ilişki bilinmemektedir. Fakat bir grup araştırmacı, hipertansiyonun sıçan modellerinde EL'nin upregüle edildiğini öne sürmüşlerdir. Anjiyotensin II ile indüklenen hipertansiyonlu sıçanlarda, EL ekspresyonu aort, kalp ve akciğerde upregüle edildi. Gözlemlerine ve endotelial lipazın lipoproteinlerin alımında oynadığı potansiyel role dayanarak araştırmacılar, EL ekspresyonunun upregülasyonunun hipertansiyonlu hayvan modellerinde doğrudan proaterojenik etkilere sahip olabileceğini öne sürmüşlerdir (147).

Sonuç olarak insanlarda yapılan bilimsel araştırmalara göre EL, esas olarak HDL-K plazma konsantrasyonunu düzenlemesi nedeniyle artan bir önem kazanmış ve ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalığın etiolojisinde önemli bir rolü olduğu kabul edilmesi gereken bir enzimdir.

2.8. Fosfolipaz A₂ Enzim Ailesi

Fosfolipaz A₂ (PLA₂)'ler (E.C:3.1.1.4), yağ asidini membran fosfolipidlerinin sn-2 pozisyonundan hidroliz ederler ve yağ asidi ve lizofosfolipidler açığa çıkarırlar. *In vivo*, fosfolipidlerin sn-2 pozisyonunda sıklıkla çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) vardır ve bunlar salındığında çeşitli aykozanoidler ve ilgili biyoaktif lipid mediyatörleri sentezinde kullanılabilirler. Kalan lizofosfolipidler de hücre sinyalleri mekanizmalarında, fosfolipidlerin yeniden oluşumunda ve membran kompozisyonunda önemli rol oynamaktadırlar (148). Birçok memeli dokusunda, pankreas sıvısında, yılan ve arı zehirlerinde ve patojen bakterilerde bulunan bir enzim ailesidir. Kandaki PLA₂ kaynağını büyük oranda monosit, makrofaj, trombosit ve tümör hücreleri oluşturur. Fosfolipidlerin yıkımı ve yeniden şekillendirilmesinden sorumludurlar. Aktivite için tripsin ve safra tuzları gereklidir. Glukokortikoidler tarafından inhibe edilirler.

PLA₂'ler; romatoid artrit, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalık, bazı nörolojik olaylar, tümör oluşumu ve diğer inflamatuvar hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar koşulların patogenezinde rol oynar. PLA₂, çeşitli hastalıkların tedavisinde gelecekte önemli farmakolojik bir hedef ve biyolojik belirteç haline gelmiştir.

Bugüne kadar 30'dan fazla PLA₂ izoformu tanımlanmıştır ve işlev, kofaktör gereksinimi ve boyut açısından büyük ölçüde farklılık gösterir. İzofomlar, 6 ana gruba ayrılır:

- 1)İntrasellüler cPLA₂,
- 2)Ca-bağımsız iPLA₂,
- 3)Salgısal PLA₂,
- 4)Lizozomal PLA₂(LPLA₂),
- 5)Adipoz spesifik PLA₂(Ad-PLA₂) ve
- 6)Trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz (PAF-AH)

Araştırmalar bu grupların her biri içinde, çok sayıda alt tip belirlemiştir (149).

2.8.1. Salgısal Fosfolipazlar

sPLA₂, gliserolipidlerin sn-2 pozisyonundaki ester bağı, yağ asidi seçiciliği göstermeksizin mM Ca⁺² konsantrasyonu varlığında hidroliz ederler (21). Moleküler yapı, altı ila sekiz disülfid bağından oluşur. sPLA₂ ailesi tipik olarak çok düşük moleküler ağırlıklı (14-19 kDa), His – Asp içeren katalitik bölge taşıyan ve kofaktör olarak Ca⁺² gerektiren enzimlerden oluşur. Çok sayıda bağ içerirler ve aktif bölgede aynı aminoasitleri taşırlar. Klasik sPLA₂'ler yılan veya böcek zehirinde bol miktarda bulunur. sPLA₂'lerin salgılandıktan sonra, lipid sentezini arttırmak için komşu hücrelerde (parakrin) veya kaynak hücrelerinde (otokrin) plazma membran fosfolipidleri üzerinde etkili olabileceği öne sürülmüştür (150) .

Fonksiyon: Vücutta çok çeşitli işlevlere hizmet ettiği gösterilmiştir. Enzim, birçok gram pozitif ve gram negatif bakteriye karşı güçlü antibakteriyel ve antiviral aktiviteye sahiptir. Bu aktivitenin arkasındaki mekanizma, peptidoglikan hücre duvarının membran fosfolipidlerinin degradasyonu ile penetrasyonunu içerir (149). Ayrıca, sPLA₂'ler, negatif yüklü fosfolipid baş grupları, özellikle PS, gliserofosfolipid ve PE için güçlü bir afinite gösterir (151). sPLA₂'nin antiviral mekanizması, konakçı hücrelere viral girişi önleyen kemokin reseptörlerinin inhibisyonunu içerir. sPLA₂'nin bir diğer önemli işlevi, prostanooidler ve lökotrienler tarafından iltihaplanmanın başlatılmasıdır. Bu aracılık, araşidonik asidin bozunması ve ardından biyolojik olarak kullanılabilir aykozanoid bileşiklere dönüştürülmesiyle oluşur (149).

Patofizyoloji: sPLA₂; romatoid artrit, ateroskleroz, astım, akut respiratuvar distres sendromu, Crohn hastalığı, sepsis, ülseratif kolit ve tümör hücresi büyümesi dahil olmak üzere inflamasyonu içeren birçok durumun patogeneziinde önemli bir rol oynar. Aterosklerozun patogenezi, sPLA₂'nin artmış ekspresyonu ile de ilişkilidir. Ön görülen mekanizma, makrofaj alımı ve ardından intimal lipid birikimi ile sonuçlanan LDL partiküllerinde fosfolipidlerin hidrolizini içerir. Çalışmalar, oksidatif hasardan kaynaklanan koroner damarların aterosklerozunun bir sonucu olarak sPLA₂'nin kan seviyeleri ile koroner arter hastalığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (149).

Klinik Önem: Son araştırmalar; sPLA₂'nin, araşidonik asit ve metabolitlerinin kolorektal kanser, meme, pankreas ve prostat kanserinin gelişiminde rol oynadığını göstermektedir (152). Ayrıca sPLA₂ aşırı ekspresyonunun, prostat kanserlerinde kötü

klirik prognoz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (151). H¼credeki çeşitli fizyolojik s¼reler ¼zerinde ¼nemli bir etkiye sahip olan sPLA₂ ekspresyonunda ve araşidonik asit metabolizmasında bir dengesizlik vardır. Çok sayıda çalışma, siklooksijenaz-2 ekspresyonunun da arttığını, dolayısıyla kolorektal kanser, prostat kanseri ve meme kanseri dahil olmak ¼zere çeşitli kanser t¼rlerinin anahtar ¼zelliđi olan mitojenik prostaglandinlerin sentezini arttırdığını g¼stermektedir.

Genel olarak, en etkili inhibit¼rler, ¼rn., İndol t¼revlerine dayanır. İndoksam, metilindoksam ve LY311727. Bunlardan bazılarının, iltihaplanmanın hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda başarılı olduğu g¼sterilmiřtir (152). Varespladib geniş spektrumlu enzim inhibisyonu yoluyla aterosklerotik lezyonların boyutunda ¼nemli bir azalmaya ve farelerde HDL'de bir artışa neden olduğu g¼sterilmiřtir (149).

Bug¼ne kadar, 17 farklı sPLA₂ izoformu tanımlanmıştır (Grup I-III, V, IX-XIV). 17 sPLA₂ izoformu arasında 11'i (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA ve XIIB) memeli h¼crelerinde eksprese edilir.

- 1) Geleneksel grup (I, II, V ve X)
- 2) Atipik grup (III ve XII) (150,151)

Transjenik ve knock-out fareler kullanılarak yapılan son çalışmalar, çeşitli sPLA₂'lerin farklı işlevleri olduğunu ortaya koymuştur.

sPLA₂-IIA: EL'ye benzer şekilde, sPLA₂-IIA, PE'ler gibi anyonik fosfolipidlere karşı g¼l¼ afiniteye sahiptir (118). sPLA₂-IIA, sekretuar b¼lmede araşidonik asit salınımı ve aykozanoit ¼retimine dahil olan iyi bilinen bir pro-inflamatuar enzimdir ve genellikle "inflamatuar sPLA₂" olarak adlandırılır (118).

Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, dikkatler başlangıçta sPLA₂-IIA'nın aterosklerozdaki potansiyel rol¼ne odaklandı, ¼nk¼ bu enzim insan aterosklerotik plaklarında artmıştır ve sPLA₂-IIA transjenik fareleri ateroskleroz gelişimine duyarlıdır (153).

sPLA₂-III: Birçok memeli salgılanan fosfolipaz A₂ enzimi arasında, sPLA₂-III, sıradışı N- ve C-terminal alanlarına sahip olması ve merkezi sPLA₂ alanının, arı zehirli PLA₂'ye homolog olması bakımından diğer memeli sPLA₂'lerine g¼re benzersizdir

(150). Proenzim olarak salgılanır ve tam aktivite için N-terminalinden bölünmeye ihtiyaç duyar (151).

sPLA₂-III, çeşitli dokuların vasküler endotelyumunda, alveolar epitel ve makrofajlarda, periferik ve merkezi sinir sistemlerinde ve çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu tespit edilmiştir (150). sPLA₂-III 'ün lipolitik etkisiyle LDL partikülünü daha küçük hale getirdiği ve ayrıca LDL yüklü makrofajlarda lipid damlacıklarının birikimini indüklediği ortaya koyulmuştur. Ayrıca HDL'nin sPLA₂ ile hidrolizi bu antiaterojenik parçacığın lipit yönünden zengin köpük hücrelerinden kolesterol akışını teşvik etme kapasitesini azaltır. Aterosklerozun ilk aşaması olan yağlı çizgi lezyonları olan intimal hücrelerde ve stromada sPLA₂-III alanları saptanmıştır, bu da sPLA₂-III ekspresyonunun ateroskleroz gelişimi ile birlikte arttığını düşündürmektedir. Bu bulgular, sPLA₂-III'ün aterojenik lipoprotein parçacıkları üretebilen ve dolayısıyla ateroskleroz gelişimini teşvik etme potansiyeline sahip başka bir sPLA₂ enzimi olduğu fikrini desteklemektedir ve yeni bir antiaterosklerotik ilacın geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olmaya adaydır (153). Anafilaksiye neden olan önemli bir arı zehiri bileşeni olan arı zehiri PLA₂, sPLA₂'nin atipik bir şeklidir. Memeli genomundaki tek arı zehiri PLA₂ homologu sPLA₂-III'tür. Arı zehiri PLA₂ gibi eksojen sPLA₂-III, fare derisinde mast hücre aktivasyonunu ortaya çıkarır ve insan sPLA₂-III'ün transgenik aşırı ekspresyonu, spontan cilt iltihabına yol açar. Mast hücrelerin obezite ve aterosklerozda rol oynadığı düşünüldüğünde, sPLA₂-III'ün bu metabolik hastalıklardaki rolü de incelenmeye değer olacaktır (150).

Bütün bu enzim ve proteinlerin fonksiyonlarını genel olarak değerlendirdiğimizde:

PLTP aktivitesini, hücre membranlarında ve lipoprotein fosfolipidleri üzerinde gösteren bir proteindir. Olgun HDL oluşumu için lipidleri, fosfolipidleri ve serbest kolesterolü VLDL veya şilomikron yüzeyinden yeni oluşan HDL'ye aktarabilir. Ayrıca PLTP, lipoproteinler arasında fosfolipid değiş tokuşu yapar ve HDL3'ten VLDL'ye kolesteril ester transferine yardım eder (96). Hücre membranları üzerinde de fosfolipid kompozisyonunda değişikliklere neden olduğu belirtilmektedir (102,109). Fare dokularında yapılan gen analizleriyle, PLTP'nin sirkadiyen ekspresyona tabi olduğu ortaya koyulmuştur (16).

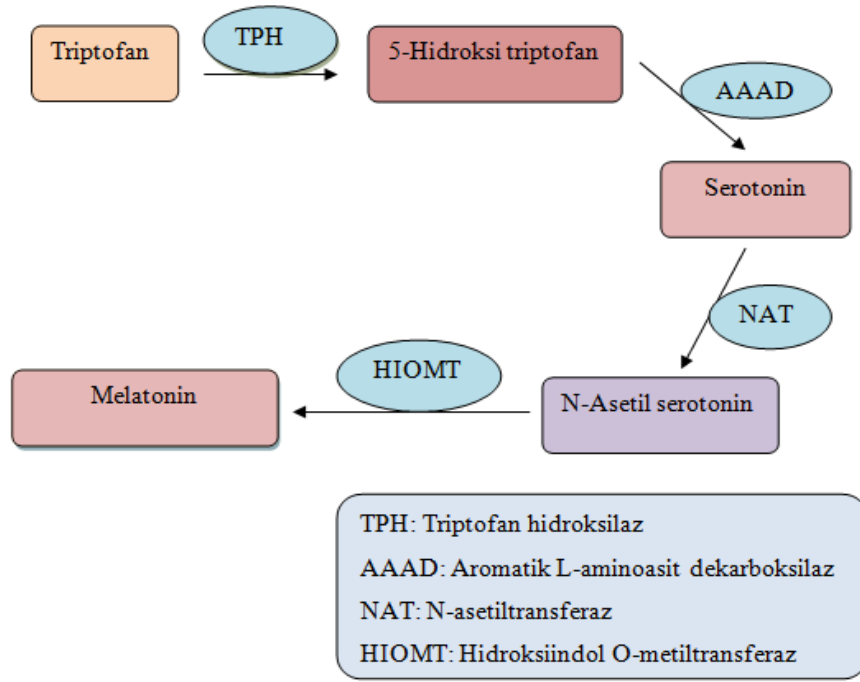
LCAT, kolesterolü esterleştirme kabiliyeti olan ve çoğunlukla HDL'ye ve düşük oranlarda diğer lipoproteine reversibl bağlanan bir enzimdir. LCAT aktivitesi sonucunda hücre zarından kolesterol ATP Binding Cassette proteinler vasıtasıyla HDL'ye aktarılır ve sonuçta PC'den bir yağ asidi kolesterole aktararak kolesterol esteri oluşturulurken PC'den lizofosfatidil kolin sentezlenir (112). LCAT'nin fare dokularında sirkadiyen osilasyon gösterdiği tespit edilmiştir (16).

EL, primer olarak fosfolipaz aktivitesi ve buna ilaveten trigliserid lipaz aktivitesi vardır (22,127). EL'nin primer substratının HDL olduğu, ancak apo B içeren lipoproteinleri de hidrolize edebildiği görülmüştür. HDL-PC'lerinin sn-1 pozisyonundan yağ asitlerini serbest hale getirir (154). EL enzimlerinin, fare karaciğerinde ritmik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (17).

sPLA₂'ler , membran gliserolipidlerinin sn-2 pozisyonundaki ester bağı, yağ asidi seçiciliği göstermeksizin Ca⁺² varlığında hidrolize eden enzimlerdir (21). Çeşitli sPLA₂'ler LDL ve HDL PC'lerini hidrolize ederek LizoPC üretmektedirler (153). 14 farklı fare dokusunda yapılan gen analizleri, çeşitli türlerde PLA₂'lerin ritmik olarak eksprese edildiği gösterilmiştir (16).

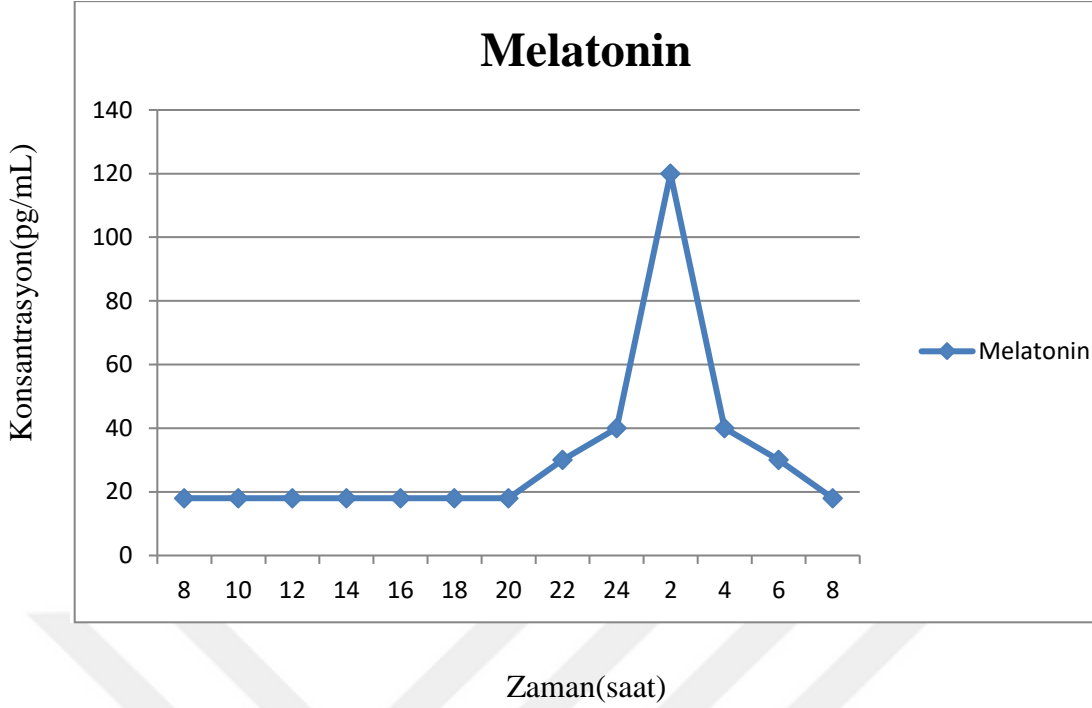
2.9. Melatonin

Melatonin, insan ve memelilerde epifiz bezi tarafından salgılanan indolik yapıda bir hormondur. Ekstrapineal sentez yerleri; retina, kemik iliği hücreleri, trombositler, deri, lenfositler, enterokromaffin hücreler, serebellum ve özellikle omurgalı türlerinin gastrointestinal sistemi olarak bildirilmiştir (24). Amfifilik yapısı nedeniyle melatonin, pinealositlerin içinde depolanmaz, sentezlenirken salınır. Epifiz bezi bolca vaskülarize edilir ve üçüncü ventrikül duvarına dorsal ve posterior bağlanması, melatoninin gece boyunca merkezi sinir sisteminin beyin omurilik sıvısına ve ayrıca kan dolaşımına salınmasına izin verir. Kanda melatonin genellikle albümine bağlanır (155).



Şekil 2.1. Melatonin sentez basamakları (156)

Melatonin sentezi ve salgılanması karanlıkla artar ve ışık tarafından (özellikle mavi aralıkta) inhibe olur. İnsanlarda salgısı gün batımından hemen sonra başlar, gece yarısı pik yapar (sabah 2 ile 4 arasında) ve gecenin ikinci yarısında yavaş yavaş azalır. Melatoninin yaklaşık % 80'i geceleri sentezlenir ve serum konsantrasyonları 80 ile 120 pg / mL arasında değişir. Gündüz saatlerinde serum konsantrasyonları düşüktür ve 10-20 pg / mL'dir (Şekil 2.2.). Bu yüzden sıklıkla “karanlığın hormonu” olarak anılmaktadır (24).



Şekil 2.2. Melatoninin insan plazma konsantrasyonlarının sirkadiyen osilasyonu (24)

Melatonin, çoğunlukla karaciğerde mikrozomal P450 enzimleri (esas olarak CYP1A2) ve ikincil olarak böbrekte hızla 6-hidroksimelatonine metabolize edilir. Ardından sülfürik asit (% 90) veya glukuronik asit (% 10) ile konjüge olur ve idrarla atılır (serum melatoninin yaklaşık % 5'i değişmeden atılır). Ana metaboliti olan 6-sülfatoksimeletonin inaktiftir ve idrarla atılımı plazma melatonin konsantrasyonlarını yansıtır.

Melatoninin en belirgin etkileri, iki zara özgü reseptörün aktivasyonu ile gerçekleşir: yüksek afiniteli ML1 ve düşük afiniteli ML2. ML1 reseptörünün iki alt türü vardır: Mel1a (veya MT1) ve Mel1b (veya MT2). Mel1a, ön hipofizin pars tuberalisi, hipotalamusun SCN'si, korteks, talamus, substantia nigra, nukleus akübens, amigdala, hipokampus, serebellum, kornea ve retina da yaygın olarak dağılmıştır; Mel1b esas olarak retina ve ikincil olarak hipokampus, korteks, paraventriküler çekirdek ve serebellumda dağılmıştır. Melatonin reseptörleri T ve B hücreleri, kalp ve arterler, adrenal bez, böbrek, akciğer, karaciğer, safra kesesi, ince bağırsak, adipositler, overler, rahim, meme, prostat ve deri dahil olmak üzere periferik dokulara dağılım göstermiştir (157).

Melatoninin sentezi ve salgılanması, hipotalamik SCN'de bulunan 'ana biyolojik saat' tarafından kontrol edilmektedir (158). Melatonin üretiminin, retinal

ışığın algılanmasından ve birçok sinaptik yolla epifiz bezini kontrol eden SCN'deki nöronların endojen ritminden etkilenir. Bu kompleks ve çok iyi organize edilmiş kontrol sistemi, melatonin salgılanma süresinin ve zamanlamasının mevsimlere göre değişmesine imkan sağlar (157). Çalışmalar, kandaki gece melatonin düzeylerinin artmasının, vücudun hücrelerine ve organlarına gece olduğu sinyallerini gönderebileceğini ve hedef organları ve organ sistemlerini uygun homeostatik metabolik ritimlere göre düzenlemeye yardımcı olabileceğini göstermiştir (158). Melatonin önemli bir fizyolojik uyku düzenleyicidir. Geceleri uyku eğilimindeki keskin artış, genellikle insanlarda endojen melatonin üretiminin başlamasından 2 saat sonra meydana gelir (159). Melatonin sirkadiyen ritmi düzenleyebilir ve uyku bozukluklarını iyileştirebilir (156). Ayrıca, bir dizi çalışma melatonin ve melatoninerjik ajanların uykusuzluğun tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir, çünkü uykunun başlamasını hızlandırabilir, uyku süresini uzatabilir ve uyku yapısını biraz değiştirebilir. Bununla birlikte uzun seyahatlerin neden olduğu bozulmuş sirkadiyen ritimlerin tipik bir örneği olan jet lag'ı önlemede ve tedavi etmede melatonin kullanıldığı uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca yüksek melatonin seviyelerinin memeli pars tuberalis'te sirkadiyen ritimleri sıfırlayabileceği bilgisi de dikkate değerdir (156). Melatoninin uyku-uyanıklık döngüsünü düzenlemekle birlikte, aynı zamanda endojen bir senkronizör ve kronobiyotik bir molekül; yani salınımları güçlendiren veya bedensel ritimleri stabilize etmek için hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeklerinde bulunan merkezi saatin zamanlamasını ayarlayan bir madde olarak kabul edilir.

Melatonin, uyumlu iç işleyişin gelişmesine ve iç çevrenin dış ortama adaptasyonuna izin veren merkezi ve periferik osilatörlerin düzenliliği ve senkronizasyonunda önemli bir rol oynar. Günlük salgı ritmi aracılığıyla çok sayıda dokuya reseptör aracılı zamansal ipuçları dağıtır; örneğin adenohipofiz gibi bazı dokularda sirkadiyen ritimleri harekete geçirir veya fetal adrenal bez ve ayrıca diğer birçok periferik dokudaki (pankreas, karaciğer, böbrek, kalp, akciğer, yağ, bağırsak vb.) periferik osilatörleri senkronize eder.

Sirkadiyen ritimler ve daha doğrusu sirkadiyen saatler ağı, periyodik çevresel değişikliklerle ilgili olarak biyolojik işlevlerin zamansal organizasyonuna izin verir ve bu nedenle çevreye adaptasyonu yansıtır. Böylece biyolojik sirkadiyen ritimlerle ilişkili gündüz-gece döngüsüne bir adaptasyon olarak uyku-uyanıklık ritmi görülebilir. Melatoninin merkezi ve periferik osilatörler üzerindeki başlıca senkronize edici etkileri

göz önüne alındığında, melatonin, insan sirkadiyen zamanlamasının en iyi periferik biyobelirteci olarak kabul edilebilir (24). Melatonin organizmanın sirkadiyen ve mevsimsel zamanlaması; uyku ve uyanıklık döngüsüne ek olarak; enerji metabolizması, glisemik kontrol, kan lipid profili ve üreme, gebelik ve fetal gelişim ve programlama gibi endokrin fonksiyonları, kardiyovasküler sistem, bağışıklık sistemi, nöral gelişim, nöral koruma ve nöroplastisite gibi fizyolojik süreçlere de dahil olduğu ortaya koyulmuştur (155). Şimdi melatoninin sadece bir hormon değil, aynı zamanda immünomodülasyon, antioksidatif süreçler ve hematopoezde rol alan bir hücre koruyucusu olarak kabul edilmektedir (158). Anti-aging ve antikanser aktiviteler gerçekleştirir. Çok sayıda kanıt, melatoninin geniş spektrumlu bir serbest radikal temizleyici olduğunu desteklemektedir. Ayrıca melatonin, nöroprotektif etkiler de gösterebilir, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve obezite gibi kronik hastalıkların kontrolünü kolaylaştırır. Ek olarak, melatonin ruh halini, cinsel olgunlaşmayı ve vücut ısısını bile düzenleyebilir (156).

Birkaç deneysel çalışma, melatonin seviyeleri ile kanser riski arasında bir ilişki olduğuna dair kanıtlar sağlamıştır. Örneğin, kemirgen çalışmalarından elde edilen kanıtlar, pinealektominin tümör büyümesini arttırdığını, melatonin uygulamasının kimyasal olarak indüklenen meme tümörlerinin gelişimini engellediğini, sürekli ışığa maruz kalmanın ise bu tümörler üzerinde proliferatif bir etkiye sahip olduğunu bulmuştur. Melatoninin ayrıca plak oluşumu, ateroskleroz ve enfarktüs gibi kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojik sürecine dahil olduğu bulunmuştur. Melatoninin LDL-K, Total-K ve TG'leri azaltarak displipidemiye etkili bir şekilde iyileştirdiği, ancak güçlü antioksidan etkileri nedeniyle HDL-K, glukoz toleransı ve antioksidan potensini artırdığı gözlemlenmiştir. Ayrıca trombozu inhibe ettiği, vasküler endoteliumu koruduğu, inflamasyonu inhibe ettiği ve kan basıncını modüle ettiği böylelikle kardiyovasküler hastalıkların önlenmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir (156).

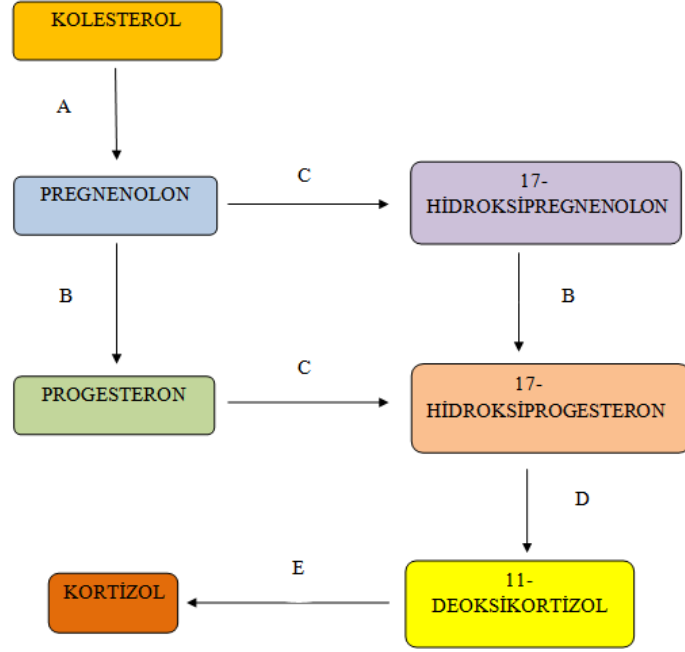
2.10. Kortizol

İnsan nöroendokrin sisteminin önemli bir bileşeni, insanlar dahil memelilerin hayatta kalması için büyük önem taşıyan hipotalamik-hipofiz-adrenal bezdin (HPA eksenini). HPA ekseninin fizyolojik işlevi, homeostazı korumak, organizmayı bedensel ve çevresel zorluklara adapte etmek ve insan davranışını, duygularını ve bilişsel

işlevlerini düzenlemek için önemlidir. HPA ekseninin ana son ürünü, sirkadiyen ritimlerle yüksek oranda ilişkili olan bir glukokortikoid hormon olan kortizoldür. Kortizol, hem insanlarda hem de insan olmayan primatlarda ana glukokortikoid olarak kabul edilir ve çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak üretilir (160).

Kortizol ve diğer glukokortikoid hormonlar esas olarak adrenal kortekste zona fasciculata mitokondrilerindeki kolesterolden elde edilir (Şekil 2.3.) (160). Kortizol, vücudun hemen hemen her dokusunda bulunan glukokortikoid reseptörlerine bağlanır (161). Kortizol; metabolizma, elektrolit dengesi, gelişim ve kognüsyon gibi çeşitli fizyolojik işlevlerde önemli roller oynar ve nöroendokrin, bağışıklık, üreme, kardiyovasküler ve sinir sistemleri gibi multipl organ sistemlerinde rol oynar (160).

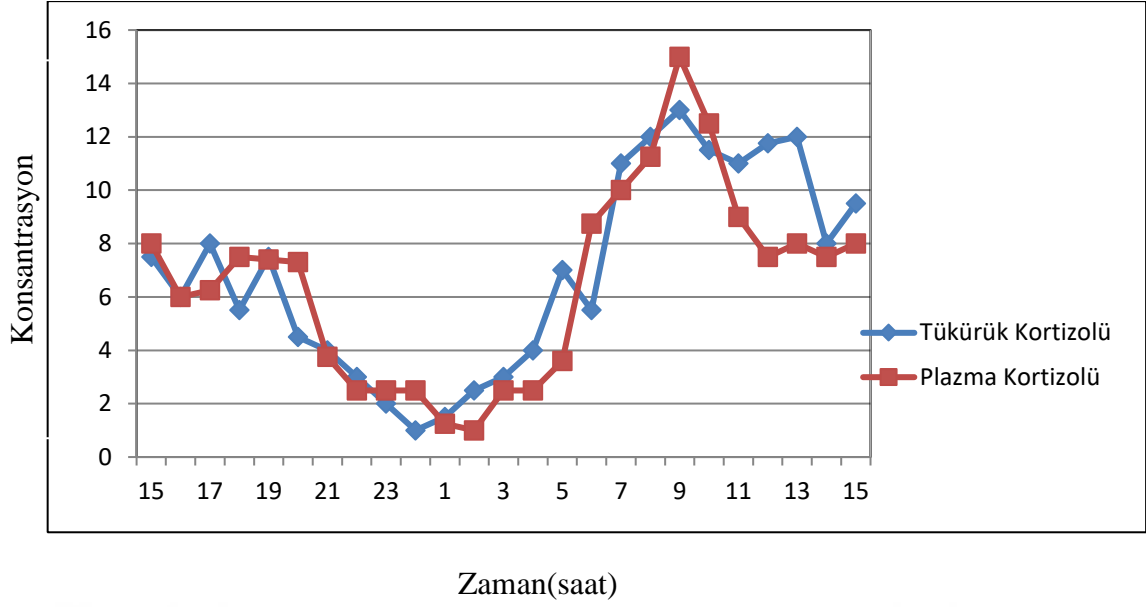
Kortizolün %80-90'ı kortizol bağlayıcı globulinle, %10'u albumine bağlı olarak dolaşır. Yarı ömrü 60-90 dk'dır. Sitozolik reseptörler üzerinden etki gösterir (162). Adrenal korteksten kortizol salınımı, HPA ekseninin regülasyonu altındadır (25). HPA ekseninin aktivasyonu, hipotalamik paraventriküler çekirdekten kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) ve arginin vazopressini serbest bırakır ve bunlar daha sonra anterior hipofizdeki reseptörlerine (sırasıyla CRH-R1 ve V1B) bağlanır. Bu bağlanma, kan dolaşımında adrenokortikotropik hormonun (ACTH) salgılanmasını tetikler, bu da daha sonra adrenal bezi kortizol hormonlarını sentezleyip salmaya teşvik eder. Kortizol sentezinin düzenlenmesi, hipotalamus ve ön hipofizdeki mineralokortikoid ve glukokortikoid reseptörlerinin aracılık ettiği bir negatif feed-back mekanizması tarafından kontrol edilir, bu sayede yüksek serum kortizol seviyeleri CRH, arginin vazopressin ve ACTH salınımını baskılar. Buna karşılık, aşırı düşük kortizol seviyeleri, CRH ve ACTH'nin artan üretimini uyarır (160).



A:Kolesterol desmolaz, B: 3β -hidroksisteroid dehidrojenaz, C:17-hidroksilaz, D: 21α -hidroksilaz, E: 11-hidroksilaz

Şekil 2.3. Kortizol sentezinin basamakları (25)

Bazal HPA eksenin aktivitesi, kısa süreli ve yüksek amplitüdü birkaç salgı epizoduyla belirgin bir günlük ritmi takip eder (161). Kortizol sentezi de normal koşullarda bu sirkadiyen ritmi takip eder: Seviyeler sabah (07:00–08:00) uyanma saatlerinde yüksektir, uyandıktan sonraki 30-40 dakika içinde ortalama %50-60 yükselir, uyandıktan sonraki birkaç saat içinde hızla düşer ve daha sonra yatma zamanı civarında (02:00-04:00) en düşük seviyeye ulaşana kadar daha yavaş düşer (163).



Şekil 2.4. Normal koşullardaki bireylerin tükürük ve plazma kortizol seviyelerinin sirkadiyen ritimleri (80).

Bu periyodik sekresyon, hipotalamusta merkezi bir pace-maker, suprakiazmatik çekirdek ve bezin ACTH duyarlılığını kontrol eden adrenal bez saatinin kendisi içeren doğal bir vücut zaman tutucusu olan sirkadiyen saat tarafından kontrol edilir. Kortizolün sirkadiyen salınımı vücuttaki hücre-otonom saatlerin senkronizasyonunda rol oynar ve gün boyunca hedef dokularındaki fizyolojik dinamikleri zamanlamak için onlarla etkileşime girer (25).

Sekresyonlarının belirgin bir sirkadiyen ritme tabi olması nedeniyle melatonin ve kortizol düzeylerini ve bunların idrar metabolitlerini sirkadiyen faz belirteçleri olarak kullanmak mümkündür. Üriner 6-sülfatoksimeatoninler gibi, üriner kortizol ritimlerinin de zamanlamasının kör deneklerde sirkadiyen ritimlerin izlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (26) ve mevcut araştırmalar plazma ve idrar ölçümleri arasında orta derecede bir ilişki olduğunu düşündürmektedir (164). Ayrıca araştırmacılar tükürük kortizol ölçümünün, serumdaki serbest kortizol konsantrasyonlarına yakın olduğu, günlük bir ritim sergilediği ve kortizol seviyelerinin takibi için noninvaziv olarak elde edilen tükürük numunesinin kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (165).

Kortizol ritmikliği, HPA ekseninin normal işlevi için çok önemlidir; sadece uyku ve mevsim gibi dış faktörlerden değil, aynı zamanda zihinsel, psikolojik veya fiziksel durum gibi stres faktörlerinden etkilenir (166). Stres faktörleri, özellikle “savaş ya da kaç” yanıtı sırasında, plazma kortizol düzeylerini etkileyecektir (167). Ayrıca egzersiz,

yemek ve tütüne maruz kalınan gün boyunca da kortizol seviyelerinde küçük zirveler gözlenmiştir (168). Kortizol seviyelerinin, bu dış faktörlerden etkilenmesi ve içsel değişkenliği sirkadiyen faz belirteci olarak daha az kullanımına neden olmaktadır (169).

Normal serum kortizol konsantrasyonları sabah saat 08:00 ile 10:00 arasında yaklaşık 250-850 nmol/L iken, geceleri 110-390 nmol/L'dur ve sabah 04:00 civarında en düşük seviyeleri olmak üzere, gün içindeki konsantrasyonun yaklaşık yarısı kadardır (160). Sabah uyandıktan sonraki 30-40 dakika içinde meydana gelen derin kortizol düzeyi artışı kortizol uyanma tepkisi olarak adlandırılır. Kortizol uyanma tepkisi, sabahın erken saatlerinde artan kortizol konsantrasyonlarının doğrusal eğilimine önemli bir etki eklediğinden, kortizolün sirkadiyen ritmini üst üste bindiren belirgin bir fenomen gibi görünmektedir (170). Kortizol uyanma tepkisi ile ilgili çok fazla araştırma olmasına rağmen, uyandıktan sonra keskin kortizol artışının tam işlevi hala bilinmemektedir (161). Muhtemelen kortizol uyanma tepkisi, gelecek günün zorlukları ve stres yükü karşısında kişinin adaptasyonunu kolaylaştırmaktadır (161). Uyku fazı sırasında kortizol seviyelerindeki istikrarlı artış da, vücudu uyanma ile ilişkili tipik streslere (örneğin enerji ihtiyacı) ve artan aktivite beklentisindeki rolü ile tutarlıdır (25).

Kortizol, SCN'den periferik dokulara sirkadiyen mesajı iletmenin yollarından birini sağlar. Uyandıktan sonraki kortizol zirvesi, vücudu bir dizi genomik olmayan eylem boyunca hem uyku-uyanıklık hem de aydınlık-karanlık döngüleriyle senkronize etmede özel bir rol oynadığına inanılmaktadır (171). Ayrıca sirkadiyen ritimlerin günün saatinin mesajını vücuttaki birçok sisteme ve özellikle de immun sisteme aktardığı anlaşılmaktadır. İyi bir fiziksel ve zihinsel esenlik için sirkadiyen koordinasyon esastır ve sirkadiyen aktivitenin bozulması, çeşitli merkezi ve çevresel sistemlerin işleyişini etkileyebileceği ve bu etkilerin zaman içinde çok çeşitli olumsuz sağlık sonuçlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (172). Örneğin önceki çalışmalar; Cushing sendromu (173), depresyon (174), yorgunluk (175), kardiyovasküler hastalık (176), Alzheimer hastalığı (177), metabolik sendrom (178), tümör baskılanması ve mortalite (179) dahil olmak üzere birçok hastalıkta sirkadiyen glukokortikoid regülasyonunun değiştiğini göstermiştir.

Sirkadiyen ritim bozukluklarının bir sonucu olarak aşırı kortizol, HPA eksenini negatif feed-back mekanizmasının kaybıyla birleştiğinde, Cushing sendromunun ortaya

çıkmasına neden olabilir (160). Hiperkortizolizmin doku ve organlarda, yani karaciğer, yağ ve iskelet kaslarında da insülin direncini tetiklediği gösterilmiştir (181). Ayrıca fetüste prenatal kortizol düzeylerinin artmasının fetal büyümeyi geciktirebileceğini bildirmiştir (167).

Sabahtan akşama kadar olan kortizol seviyelerindeki değişikliklere günlük kortizol eğimleri denir. Daha düz günlük kortizol eğimleri, önceki teori ve araştırmalarda kronik psikososyal stres ile zayıf zihinsel ve fiziksel sağlık sonuçları arasında bir mediyatör olarak önerilmiştir ve bazı sağlık bozuklukları ele alınmış ve günlük kortizol eğimleri bazı sağlık bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir (182). Günlük kortizol eğimleri ve fiziksel sağlık bozuklukları arasındaki ilişkilerin anlaşılmasında, kortizolün iştahı, metabolizmayı, yağ birikimini ve özellikle viseral yağlanmayı düzenlemede rol oynadığı dikkate değerdir (183). Kortizolün enerji düzenlemesindeki önemli rolü ve daha düşük kortizol seviyeleri ile uyanmanın artan yorgunluk ile ilişkili olduğunu gösteren önceki çalışmalar göz önüne alındığında (175), daha düz günlük kortizol eğimleri ve yorgunluk arasındaki ilişkilerin bulguları da şaşırtıcı değildir (182).

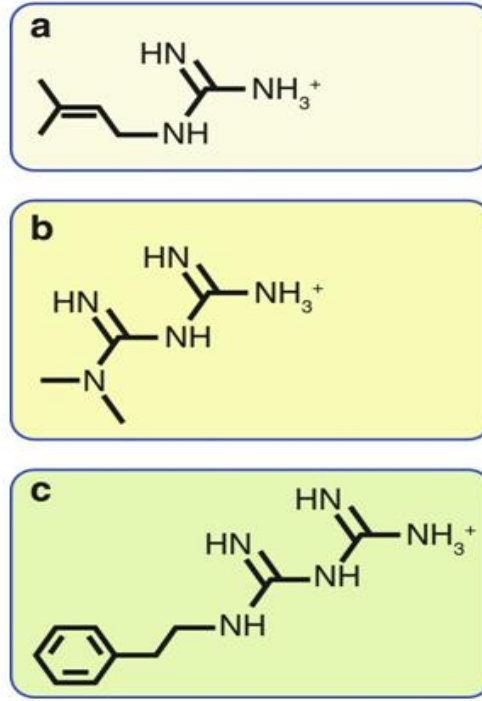
Glukokortikoidler, duygusal ve davranışsal işlevi merkezi olarak yer alan limbik bölgeler de dahil olmak üzere beyindeki glukokortikoid ve mineralokortikoid reseptörlerine ulaşmak için kan-beyin bariyerini geçer (184,185) ve uyarılma, ödül, korku/tehdit ve kayıpla ilişkili nöral sistemleri etkiler (185). Bu yüzden yapılan çalışmalarda bazı ruh sağlığı bozukluklarında kortizol seviyeleri değerlendirilmiştir. Depresyonda özellikle akşam saatlerinde bazal kortizol seviyeleri daha yüksek bulunmuştur (186). Bu bulgular, değişen günlük kortizol işlevi ile çoklu ruh sağlığı bozukluklarının semptomları arasındaki ilişki için bir temel sağlar (182).

En güçlü etki büyüklüğü ise, kortizol ile immün ve inflamatuvar sonuçlar arasındaki ilişkiler için bulunmuştur. İmmün düzenleyici etkileri arasında, glukokortikoidlerin tümör baskılanmasında ve kanser hastalığının ilerlemesinde ve ölümden önemli bir rol oynayan doğal öldürücü hücreleri etkilemesi yer alır (187). Glukokortikoidlerin, immün ve inflamatuvar sistem biyolojisinin anahtar düzenleyicileri ve değiştiricileri olduğu göz önüne alındığında (188) günlük kortizol eğimleri ve kanser ilerlemesi arasındaki meta-analitik ilişki açıklanabilir gibi görünmektedir (182).

2.11. Metformin

Metformin Ortaçağ Avrupa'sında Galega officinalis bitkisinden elde edilen doğal bir ürün olan galeginden sentezlenmiştir. Galegine, 1920'lerde insanlarda hipoglisemik etkili bir ajan olarak test edildi, ancak çok toksik olduğu bulundu (189,190). Aynı zamanlarda, galeginin iki sentetik türevi olan metformin ve fenformin sentezlendi ancak 1950'lere kadar klinik alanda kullanıma girmediler (191).

Kimyasal olarak, galegin, guanidinin bir izoprenil türevi iken, metformin ve fenformin, iki eşleştirilmiş guanidin molekülü içeren biguanidler ailesinde yer alır. Fenformin ciddi laktik asidoz yapması nedeniyle klinik kullanımdan çekildi fakat bu yan etki metforminde çok nadir görülmektedir. Çoğu modern ilacın aksine, metformin bitkisel tıpta kullanılan doğal bir üründen elde edilir ve belirli bir yolu veya hastalık mekanizmasını hedef almak için tasarlanmamıştır. Güvenli ve etkili bir tedavi olarak kullanıma sunulmuş ve 70 yıllık klinik kullanımına rağmen moleküler etki mekanizmaları halen tam anlaşılamamıştır (192). Metformin, şu anda T2DM hastalarının birinci basamak tedavisinde yer almaktadır ve dünya çapında oral antihiperглиsemik olarak en çok reçete edilen ilaçtır (193). Son klinik deneyler, metforminin, T2DM tedavisindeki etkinliğine ek olarak, diyabetik nefropati, kardiyovasküler hastalıklar, polikistik over hastalığı ve kanser riskinin azalması ve kanser prognozunun iyileşmesi (194) ve anti-aging alanlarında da terapötik potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir. Metforminin umut vadeden ve araştırma safhasında olan yeni klinik endikasyon alanları da mevcuttur. Bunlar; gestasyonel diyabet, diyabet önleme, sirkadiyen saatin düzenlenmesi ve kanser tedavisidir (195).



Şekil 2.5. Galegin, metformin ve fenforminin kimyasal yapıları.

Metformin ve fenformin, galejinin sentetik türevleridir. Kimyasal olarak, (a) galegin (izoprenilguanidin olarak da bilinir), guanidinin bir izoprenil türevi iken (b) metformin (dimetilbiguanid) ve (c) fenformin (fenetilbiguanid), ek ikamelerle birlikte iki eşleşmiş guanidin molekülü içeren biguanidlerdir (192).

Tek bir oral metformin dozundan sonra, metforminin biyoyararlanımı yaklaşık %40 ila %60'dır. Metformin, absorpsiyonun ardından birçok dokuya hızla dağılır ve plazma proteinlerine bağlanmaz (196). Metformin esas olarak gastrointestinal sistem, böbrek ve karaciğerde birikim gösterir. Metformin renal atılıma uğrar ve esas olarak idrarla değişmeden atılır. Metforminin herhangi bir metaboliti veya konjugatı tanımlanmamıştır. Metforminin renal klirensi, glomerüler filtrasyon hızından çok daha fazladır, bu da glomerüler filtrasyon hızına ek olarak tübüler sekresyonun önemli bir katkısı olduğunu düşündürür (196). Kimyasal olarak, fizyolojik pH'da katyonik türler olarak (>%99,9) bulunan hidrofilik bir bazdır. Sonuç olarak, hücre zarlarından pasif difüzyonu çok sınırlıdır ve geçiş için bir taşıyıcıya ihtiyaç duyar. Metforminin oral absorpsiyonu, hepatik alımı ve renal atılımına, çok büyük ölçüde organik katyon taşıyıcıları aracılık eder (197). Metforminin hepatositlerdeki tercihli etkisi, organik katyon taşıyıcı 1'in baskın ekspresyonundan kaynaklanmaktadır. Ayrıca, farede organik katyon taşıyıcı 1 geninin silinmesi, hepatositlerde metformin alımını önemli ölçüde

azaltır ve genin polimorfizmlerini (SLC22A1) taşıyan insan bireylerde, kan glukoz düzeylerini düşürmede metforminin bozulmuş bir etkisi görülür (198).

Etki mekanizmaları: Metformin, birden fazla etki alanı ve birden çok moleküler mekanizmaya sahip karmaşık bir ilaçtır. Yapılan son çalışmalar metforminin ana etkisinin, mitokondriyal solunum zinciri kompleksi I'in hafif bir inhibisyonu yoluyla hepatik glukoz üretimini azaltmak olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kompleks I'in spesifik ve reversibl inhibisyonu NADH oksidasyonunda, iç mitokondriyal membran boyunca proton pompalamasında ve oksijen tüketim oranında bir azalmaya neden olur ve proton gradyanının düşürülmesine ve nihayetinde ADP ve inorganik fosfattan (Pi) proton güdümlü ATP sentezinde bir azalmaya yol açar (195). AMP:ATP ve ADP:ATP oranları artar ve AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) aktive olur (199).

Kompleks I inhibisyonu için AMPK aktivasyonunun gerekmediği insan hepatositlerinde yapılan bir çalışmada gösterilmiş, AMPK aktivasyonunun ise bu inhibisyona sekonder olarak meydana geldiği düşünülmektedir (199). Bununla birlikte, metformin tarafından hepatik glukoz üretiminin inhibisyonunun karaciğere özgü AMPK nakavt farelerde korunduğunu gösteren son bulgular, diğer mekanizma(lar)ın dahil olduğunu kuvvetle desteklemektedir (199). Böylece, solunum zinciri kompleksi I'in metformin tarafından inhibisyonunu takiben hepatik enerji durumundaki azalma, muhtemelen ilacın hepatik glukoneogenezin akut azalmasının ana açıklamasıdır (200,201). Ayrıca hepatik glukoneojenezin transkripsiyonel olarak da metformin kaynaklı AMPK aktivasyonu aracılı inhibe edildiği düşünülmektedir (202).

AMPK, hücrel ATP tükenmesi ile aktive edilen enerji homeostazının kritik bir düzenleyicisidir. AMPK, katalitik bir alfa alt biriminden ve katalitik olmayan beta ve gama alt birimlerinden oluşan bir heterotrimerik serin/treonin protein kinazdır (203). AMPK, sistemik ve hücrel enerji durumunu izleyen bir yakıt göstergesi olarak görülür ve enerji kısıtlı koşullar altında hücrel fonksiyonların korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (195). AMPK aktivasyonu, hücreyi anabolik yollardan katabolik yollara geçirir (204) Hepatik glukoneogenez inhibe edilir (205). Sonuç olarak, glukoz, lipid ve protein sentezi ile hücre büyümesi inhibe edilirken, yağ asidi oksidasyonu ve glukoz alımı uyarılır (195). Metformin, ekstra-hepatik lokasyonlarda da metabolizmayı etkileyebilir.

Yağ asidi sentezinde anahtar enzim olan asetil-CoA karboksilazı inaktive eder. Azalan yağ asidi sentezi ve peroksizome proliferatör-aktive reseptör α 'nın aktivasyonu mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu ile sonuçlanır (206). Kaslarda GLUT4 translokasyonunu ve glukoz alımını artırır (207). Ayrıca bağırsak tarafından glukoz kullanımını artırır, glukagon benzeri peptit-1 sekresyonunu artırarak glukoz metabolizmasını da etkileyebilir (192). Metformin, hipotalamusa ulaşmak için kan-beyin bariyerini geçebilir ve AMPK aracılı besin alımını etkileyebilir. Metforminin anoreksik etkisine nöropeptid Y ve Agouti ile ilişkili proteinin inhibisyonu aracılık edebilir (208,209). Endojen glukoz üretiminin baskılanmasına ek olarak, metforminin lipid metabolizmasını iyileştirmede de faydalı olduğu gösterilmiştir. Metforminin ob/ob farelerinde (210,211) ve yüksek yağlı diyetle beslenen kemirgenlerde (212) hepatik steatozu tersine çevirerek yağlı karaciğer hastalığını iyileştirdiğine dair kanıtlar gösterilmiş, ancak bazı klinik çalışmalarda da bildirilmiştir (213). Metforminin uzun vadeli, klinik olarak anlamlı bir etkisi de, hepatik insülin duyarlılığını arttırmaktır ve genelde insülin sensitizörü olarak tanımlanır. Fare çalışmaları, buna AMPK'nin aracılık ettiğini göstermektedir (214). Metforminin insülin duyarlılığındaki bu iyileştirici etkileri; metforminin insülin reseptör ekspresyonu ve tirozin kinaz aktivitesi üzerindeki olumlu etkilerine (215) ve de insüline duyarlı dokulardaki hücre içi kalsiyum metabolizmasındaki anormallikleri düzeltmesine (216) bağlanabilir. Ayrıca metforminin, mitokondriden yoksun bir hücre olan eritrosit metabolizmasını, membran akışkanlığını modüle ederek etkilediği gösterildiğinden, muhtemelen mitokondriyal olmayan etki alanları da mevcuttur ve araştırılmaya açıktır (217). İlginç bir şekilde, metformin, özellikle diyabetle ilişkili ölüm oranını azaltarak diyabetik komplikasyonlara karşı koruyucu özellikler göstermiştir.

Diyabetik nefropati: Hipergliseminin oluşturduğu tubuler hasarı iyileştirerek ve AMPK'dan bağımsız renal hücrelerde oksijen tüketimini azaltarak diyabetik nefropatiyi iyileştirdiği gösterilmiştir (218).

Kardiyovasküler morbidite: Metformin kullanımı, T2DM'li hastalarda daha düşük kardiyovasküler morbidite ile ilişkilidir (219–221).

Metformin ve Sirkadiyen Saat: Metforminin sirkadiyen ritimler üzerindeki etkisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Metformin metabolizmayı etkilediğinden ve metabolizma sirkadiyen saatle bağlantılı olduğundan, metformin kullanımının

sirkadiyen ritimler üzerinde etkisi olabileceği tahmin edilerek bazı incelemeler yapılmıştır.

Metformin, mitokondri Kompleksi I'i bloke ederek NADH ve AMP seviyelerinde artışa yol açar. Bu artış, faz ilerlemesine yol açan CLOCK:BMAL1 promotör bağlanmasına neden olur. Yüksek AMP seviyeleri, PER protein bozulmasına ve CLOCK:BMAL1 inhibisyonunun azalmasına yol açan CKI'yi fosforile eden AMPK'yi aktive eder. Bu, CLOCK:BMAL1 aracılı transkripsiyonun artmasına neden olur ve bu da bir faz ilerlemesine yol açar. AMPK ayrıca Asetil-Coa karboksilazı fosforile eder ve böylece Asetil-Coa karboksilazı inhibe ederek yağ asidi oksidasyonunun artmasına ve yağ asidi sentezinin azalmasına neden olur. AMPK, SIRT1 ve NAMPT'yi aktive eder, bu da artan NAD⁺ seviyelerine yol açar. Yüksek NAD⁺ seviyeleri CLOCK:BMAL1 promotör bağlanmasını azaltır, bu da faz gecikmesine yol açar. Her dokuya özgü NAMPT ve AMPK aktiviteleri arasındaki denge, saatteki faz kaymasını belirleyen unsurdur (28). AMPK aktivasyonu, sirkadiyen saatin negatif döngüsünü, PER'leri ve CRY'leri destabilize ederek sirkadiyen ritimlerin değişmesine yol açar (222,223).

Farelerde metforminin tedavisinin sirkadiyen sistem etkilerinin incelendiği bir araştırmada; metformin sirkadiyen saatin pozitif döngüsünün bilinen modülatörleri olan karaciğer CKI α ve kas CKI ϵ aktivasyonuna yol açmıştır. Bu etki, esas olarak karaciğerdeki faz ilerlemeleri ve kastaki saat ve metabolik genler ve/veya protein ekspresyonundaki faz gecikmeleri ile sonuçlanmıştır. Bu faz kaymaları, karaciğerde ve kasta farklı NAD⁺/NADH oranlarına bağlanabilir. Bu sonuçlar, metforminin karaciğer ve kas üzerindeki farklı etkilerini ve sirkadiyen saatin metabolik süreçleri düzenlemedeki kritik rolünü göstermektedir (28).

Hücre kültürü modellerini ve fareleri inceleyen bir çalışma, besine duyarlı sinyal molekülü AMPK'nin fosforilasyonu ve ardından saat bileşeni kriptokrom-1'in bozunmasını tetikleyerek sirkadiyen saatlere metabolik bilgi sağladığını göstermektedir. 5-aminoimidazol-4-karboksamid-1-beta-d-ribofuranosid (AICAR) aracılı AMPK'nın farmakolojik aktivasyonu yoluyla iskelet kasında DEC-1, NR1D1 ve CRY2 dahil olmak üzere saat genlerinin ifadesinde değişikliklere neden olmuştur. AMPK aktivasyonunun, fibroblastlarda ve karaciğerde sirkadiyen ritmi değiştirdiği gösterildi ve böylece AMPK ve CLOCK genleri arasındaki bağlantı doğrulanmıştır (223).

Yakın zamanda metforminin periferik dokuların sirkadiyen fazında dramatik bir kaymaya neden olduğu moleküler bir mekanizma önerilmiştir. Periyot uzunluğunun düzenleyicilerinden biri, sirkadiyen saat bileşeni olan mPER2'yi fosforile ederek ve bozunmasını indükleyerek periyod uzunluğunu kısaltan CKIε'dır (224,225). AMPK, CKI epsilon'un Ser-389'unu fosforile ederek CKI epsilon aktivitesinin artmasına ve mPER2'nin bozulmasına neden olur. Hem metformin enjekte edilen farelerin periferik dokularında(kalp, iskelet kası, adipoz doku) hem de metformin verilen fibroblast hücre hattında metformine bağlı PER2 bozulması ve saat genlerinin sirkadiyen ekspresyon modelinde bir faz ilerlemesi gözlenmiştir. Ayrıca metformin kaynaklı faz ilerlemesi için AMPKα2'nin gerekli olup olmadığını belirlemek için AMPKα2 knockout farelerinde aynı işlemler yapılmış ve sirkadiyen faz değişikliği gözlenememiştir. Dolayısıyla metformin ve AMPK'nın sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğu sonucuna varılabilir (222).

Metformin ve lipid emülsiyonunun, kas hücrelerinde sirkadiyen saat ve metabolik sirkadiyen ekspresyonu üzerindeki etkisini test eden araştırmacılar, lipid emülsiyonunun bozulmuş sirkadiyen saat ve metabolik gen ekspresyonuna yol açtığını, metforminin ise esas olarak yüksek amplitüdü faz kaymalarına yol açtığını gözlemlemiştir (226). Koyun gibi mevsimsel üreyen türlerde sirkadiyen saat, melatonin salgılanmasının endojen ritmini kontrol eder ve muhtemelen mevsimsel üreme ritimlerinin oluşumunda rol oynar. Koyunlarda epifiz öncesi ve sonrası yollarda yer alan farklı hipotalamik çekirdeklerde AMPK alt birimlerinin varlığı tanımlandıktan sonra sürekli karanlık koşullarda barındırılan koyunlara iki AMPK aktivatörünün; metformin ve AICAR'ın intraserebroventriküler enjeksiyonu yapılmış ve sirkadiyen ritim biyobelirteci olarak kabul gören melatonin seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçlar melatoninin sirkadiyen ritminin etkilendiğini göstermiştir (227).

Sirkadiyen saatlerin metforminin klinik etkinliğini ve/veya toksisitesini etkileyip etkilemediğini belirlemek için sağlıklı veya karaciğer saati eksikliği olan farelere günün farklı saatlerinde metformin uygulanan bir araştırmada, sağlıklı farelerde metformine yanıt olarak akut kan şekeri düşüşü, karaciğer AMPK aktivasyonu ve kan laktat seviyeleri artışı geceleri, gündüze göre daha fazla saptanmıştır. Hepatosit BMAL1 defektif farelerde hepatosit AMPK aktivasyonunun tersine dönerek gündüz daha fazla arttığı, akut kan şekeri düşüşündeki günlük saat farklarında kısmi azalışlar olduğu

bildirilmiştir. Bu da sirkadiyen saatlerin metformine yanıtı hem hücre-otonom (periferik) hem de sistemik olarak modüle ettiğini gösterir (193). Yapılan bir araştırmada sirkadiyen bozulmaya ve diyetle bağlı obeziteye aynı anda maruz kalan sıçanlarda melatonin ve metformin ile günlük kombinasyon tedavisinin, glukoz toleransını iyileştirmek için metforminin etkinliğini arttırabileceğine dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu da sirkadiyen sistemin metformin yanıtını etkileyebileceği fikrini desteklemektedir (228).

2.12. Psöriazis

Psöriazis, genetik bir zeminde çevresel faktörlerin devreye girmesi ve güçlü bir sitokin bileşenli immun sistem bozuklukları dahil olmak üzere multifaktöriyel etiyolojiye sahip yaygın, kronik, tekrarlayan inflamatuvar bir cilt hastalığıdır (229). Psöriaziste keratinosit proliferasyonu artmış, epidermis farklılaşması değişmiş ve nötrofil gibi inflamatuvar hücreler dermise infiltre olmuştur (230). Psöriazis, termoregülasyonla ilgili problemler ve ısıyı dağıtma kabiliyetinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bu problemlerden dolayı psöriazis hastalarında gece uykuya dalmada zorluk ve sirkadiyen ritim bozuklukları ortaya çıkabilmektedir (231).

Genellikle nörohumoral mekanizmalar varsayılsa da, merkezi sirkadiyen saatin ciltle nasıl iletişim kurduğu bilinmemektedir. Örneğin, farklı cilt bölümlerindeki saat ile bağlantının değişebilmesi mümkündür; bazı cilt kompartımanları sinir uçlarına çok yakın iken diğerleri değildir. Ek olarak, periferik saatlerin fazı, fiziksel aktivite ve gıda alım zamanı gibi farklı mekanizmalarla değiştirilebilir (5). Bu heyecan verici bir araştırma alanıdır çünkü uyku yoksunluğu, besin alımı ve genel olarak metabolizma yoluyla deri biyolojik işleyişine etki edebilir (232). Patofizyoloji hala belirsiz olmasına rağmen, psöriazis hastalığı da sirkadiyen ritim anormallikleriyle ilişkilendirilmiştir (233).

Bu bağlamda, psöriazis hastalığının, sirkadiyen bozulmanın patogenezinde katkıda bulunabileceği durumlar olan obezite, metabolik sendrom ve kardiyovasküler hastalık (234,235) ile bağlantılı olduğu giderek daha fazla kabul edilmektedir (55,236).

2.12.1. Derinin Bir Saati Var

Dokular, işlevlerini etkileyebilecek ve günlük değişimlerle ortaya çıkabilecek çevresel zararlı faktörlerle başa çıkmak zorundadır. Bunlara nasıl ve ne zaman tepki

verileceğini bilmek, dokuların hayatta kalması için çok önemlidir. Örneğin, karaciğerin her beslenme turu sırasında alınan potansiyel olarak zararlı maddeleri metabolize etmesi gerekirken, cilt UV radyasyon ve patojenlerle sirkadiyen bir şekilde baş eder. Dokularımız bu değişikliklere uyum sağlamanın yollarını geliştirmiştir ve vücudumuzdaki çoğu hücre, davranışlarını bu günlük dalgalanmalara göre tahmin etmelerini sağlayan, doğasında olan ve özel, kendi kendini idame ettiren bir saate sahiptir. Bu öngörülü saat mekanizması bu nedenle dokuya işlevsel bir avantaj sağlar ve sağlamlığının azaltılması organizmanın genel uygunluğunu azaltır (4). Cilt, bariyer oluşumu ve termal düzenleme dahil olmak üzere birçok işlevi yerine getirir. Cildin çevresel olarak ışığa, UV radyasyonuna, fiziksel travmalara ve sıcaklığa maruz kalması, gündüz ve gece arasında önemli ölçüde değiştiği için insan derisinin birkaç biyofiziksel ve fizyolojik parametresinin periyodik günlük dalgalanmalara sahip olması son derece olağandır (237).

Deri, birçok periferik organda olduğu gibi sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde rol oynayan sirkadiyen saat genlerini içerir (238), ve aydınlık-karanlık döngüsü ile merkezi saate senkronize edilir (233). Genetik bir çalışmada insan ağız mukozasında ve derisinde hCLOCK, hTim, hPER1, hCRY1 ve hBMAL1'in eksprese edildiği ispatlanmıştır, bu da kemirgen SCN ve periferik dokularında bulunan ile tutarlı bir sirkadiyen profil ile uyumludur (239). Ayrıca keratinositlerde, dermal fibroblastlarda ve melanom hücrelerinde saat proteinlerinin ekspresyonu gösterilmiştir (238). Sağlıklı hücrelerin fizyolojik işlevlerinin çoğunda endojen ritmisite görülmüştür (233). Keratinosit proliferasyonu (240), transepidermal su kaybı, cilt kan akışı ve cilt sıcaklığının hepsinin sirkadiyen varyasyonlara sahip olduğu gösterilmiştir (241).

Stratum corneum, akşamları sabaha göre cilt geçirgenliği daha yüksek olmakla birlikte, sirkadiyen ritim değişikliklerine uğrar. Derideki kan akış hızının öğleden sonra ve gece arttığı ve sirkadiyen ritimden etkilendiği gösterilmiştir. (241). Keratinosit proliferasyonunun da gün içinde değiştiği ve en yüksek proliferasyon oranının gece yarısı civarında meydana geldiği bulunmuştur (240). Ayrıca keratinositlerde güçlü ve ritmik PER2 protein ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (242). İlginç bir şekilde, fare epidermisi hücrelerinin daha proliferatif olduğu gece boyunca UVB radyasyonuna daha duyarlıdır ve fareler, gece UVB'ye maruz kaldıklarında gündüze kıyasla önemli ölçüde daha fazla skuamöz tümörler geliştirir (243). Kanserli cilt hücrelerinde bu ritmisitenin kaybolduğu görülmüştür (244).

Sirkadiyen ritim, çekirdek vücut ısısını ve cilt sıcaklığını da kontrol eder. Çekirdek vücut ısısı, gündüz saatlerinde gece saatlerine göre daha yüksek sıcaklıklarla öngörülebilir dalgalanmalara sahiptir; sabahın erken saatlerinde azalır (245), öğleden sonra artar ve geceleri azalır (241). Sirkadiyen zamanlama mekanizmaları gün uzunluğuna ve sıcaklığa duyarlıdır ve bu nedenle sirkadiyen saat mekanizmaları, deri içindeki mevsimsel olayların düzenlenmesi için adaydır. İlginç bir şekilde, birkaç cilt hastalığı şiddetinde (akne, atopik dermatit, seboreik dermatit) mevsimsel farklılıklar gösterir (246). Yapılan anket çalışmaları psöriazis hastalarının en sık kış aylarında alevlenme yaşadığını ve şikayetlerin mevsimsel olduğunu göstermiştir (247,248).

Bağışıklık sisteminde görülen mevsimsel adaptasyonlar, psöriazis hastalarının şikayetlerinin de mevsimsel değişikliklerden etkilenmesine yol açabilir. Kış aylarında sitokin ekspresyonunda ve C-reaktif protein seviyelerinde artışlar olması ve glukokortikoid reseptör ekspresyonunun azalmasıyla psöriazis hastalığı indüklenebilir (248,249). Psöriazis hastalığının kış alevlenmesi, mevsimdeki soğuk, karanlık ve düşük nemden kaynaklanabilir, bu da cilt geçirgenliğini, epidermal kalınlaşmayı artırabilir ve inflamatuvar mediyatör üretimini uyarabilir (250).

2.12.2. Psöriazis ve İlgili Sirkadiyen Ritim Değişimleri

Farelerde sirkadiyen saat geni CLOCK, psöriazis benzeri deri inflamasyonunun bir regülatörü olduğu belirtilmiştir. Bu da psöriazis ve sirkadiyen saat arasında bir bağlantı olabileceğini göstermektedir (230). Psöriazis patofizyolojisinin anormal sirkadiyen ritimlerle ilişkili olabileceğini öne süren birçok rapor bulunmaktadır (29,251,252). Kan basıncı, fizyolojik koşullarda geceleri daha düşük değerlerle seyreden sirkadiyen bir ritme sahiptir. Psöriatik hastalarda yapılan kan basıncı takipleri gece kan basıncının anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir (29). Ayrıca, son zamanlarda yapılan bir çalışmada, anormal sirkadiyen ritimleri olan gece vardiyasında çalışan işçilerde psöriazis riskinin arttığı bildirilmiştir (253).

Psöriatik hastalarda melatonin salgılanmasını değerlendiren bir çalışmada, melatoninin gece pik noktasını ve normal sirkadiyen ritmini kaybettiği gösterilmiştir (252). Psöriaziste IL-23, dendritik hücreler ve keratinositler tarafından aşırı üretilir ve bu sitokin, IL-17A ve IL-22 yapmak için dermis içindeki Th17 hücrelerini uyarır ve keratinositler proliferasyona gider (254–256). Genetik çalışmalar, kemirgen psöriazis

hastalığı modellerinde sirkadiyen saat tutulumu olduğunu göstermektedir. CLOCK geninin IL-23R'ünün ekspresyonunu düzenlediği dolayısıyla sirkadiyen kontrol altında olduğu bulunmuştur (230). Kaşıntı ve psöriazis hastalığı alevlenmelerinin günlük değişkenlik gösterdiği, en çok akşamları ve geceleri belirgin olduğu bilinmektedir. Sirkadiyen saatlerle bağlantılı biyolojik ritimler bu duruma bir açıklama sağlayabilir (248). Örneğin transepidermal su kaybının geceleri artması (241), kortizol seviyelerinin gece düşük seyretmesi (245) buna bir açıklık getirebilir.

2.12.3. Uyku Yoksunluğu, Bağışıklık Fonksiyonu ve Psöriazis

Kanıtlar, psöriazis hastalığında uykunun bozulduğunu göstermektedir. Uyku bozukluğu, bağışıklık sisteminin ve sempatik sinir sisteminin işleyişinde bozulmalara yol açarak muhtemelen psöriazis hastalığının sürdürülmesine ve / veya şiddetlenmesine yol açarak, olumsuz psikolojik ve tıbbi sonuçlar için risk oluşturabilir. Bu, psöriazis hastalığının yanında bir uyku bozukluğunun varlığının kardiyovasküler hastalık morbiditesi için risk artışına sebep olduğu tahmin edilmektedir (257). Uykusuzluğun kendisi immünolojik bütünlük ve sitokinlerin gece sekresyonu üzerinde önemli etkilere sahiptir (258–263) ve psöriazis hastalığı için başka bir risk faktörü olarak düşünülebilir. Stres, psöriazis hastalığı semptomatolojisini tetiklemede ilgili bir faktördür (264) ve özünde HPA aktivasyonu (265) yoluyla uyku yoksunluğuyla ilişkilidir. Aktif psöriazis benzeri iltihaplı BALB / cJ farelerinde yapılan deneysel bir çalışma, paradoksal uyku yoksunluğuna yanıt olarak pro-inflamatuar sitokin düzeylerinin arttığını göstermiştir ve değişen sitokin ortamına bağlı olarak proteaz aktivitesinin artabileceği ve bunun da epidermal bariyeri etkilediği ve psöriazis hastalığı patogenezinde katkıda bulunduğunu göstermektedir (229).

Bir gecelik uyku yoksunluğu, insanlarda cilt bariyerinin iyileşmesini (örneğin, bantın çıkarılmasından sonra) engelleyebilir. Bariyer fonksiyon iyileşmesini azaltmanın yanı sıra, uyku yoksunluğu ayrıca natürel killer hücre aktivitesini ve interlökin-1 β ve tümör nekroz faktör- α gibi plazma proinflamatuar sitokinlerini artırabilir (266). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada; sıçanlar tam veya REM uyku yoksunluğuna maruz bırakıldı ve pençelerinin plantar yüzeylerinde ve kuyruklarında lokalize, şiddetli, ülseratif ve hiperkeratotik kutanöz lezyonlar geliştiği gözlemlendi (267).

Normal 8 saatlik uyku süresinin %25 ile %50'si kadar uyku kısıtlaması, inflamasyon aracılarının artmasıyla da ilişkilendirilmiştir (268). Bazal inflamatuvar

sitokin düzeylerindeki küçük ve bireysel subklinik değişiklikler, metabolik sendromun gelecekteki gelişimi ile ilişkilendirilebilir. Bu durum muhtemelen uyku yoksunluğuna bağlı otonom sinir sistemi aktivasyonundan kaynaklanmaktadır (268) ve uykuyu bozan psöriazis hastalığı gibi bazı dermatolojik durumlarda metabolik sendrom gelişmesine de açıklık sağlayabilir (32).

2.12.4. Sirkadiyen Bozulmanın Cilt Üzerindeki Etkisi

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, sirkadiyen bozulmanın başta metabolik ve kardiyovasküler hastalıklar ve kanser olmak üzere birçok hastalıktaki rolüne dair kanıt sağlamaktadır (234,235,269–271). Sirkadiyen bozulma ile ilişkilendirilen psöriazis hastalığının da birçok hastalıkla bağlantılı olabileceği öne sürülmüştür. Psöriazis hastalarının genel popülasyona kıyasla metabolik sendroma sahip olma olasılığının daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca daha şiddetli psöriazisi olan hastalar, daha hafif psöriazisi olanlara göre daha fazla metabolik sendrom olasılığına sahiptir. Bu bulgular, psöriazisli hastaların metabolik sendrom açısından taranması gerektiğini vurgulamaktadır (234). Obezite , psöriazis hastalığına yatkınlık yaratır ve bunun tersi de geçerlidir, ancak ikincisi için daha az kanıt vardır ve psöriazis hastalarında kilo kaybı, kardiyovasküler risk faktörlerini (örn., Arteriyel hipertansiyon, diyabet ve hiperkolesterolemi) iyileştirir (235).

2.13. Gece Vardiyası

Günümüzde insanlar yapay ışık, ısı ve 24 saatlik döngüsel bir düzeni takip etmeyen birçok uyarıcı faktöre maruz kalmaktadırlar. Bu uyarıcılar, dış düzenleyiciler ve sirkadiyen ritimler arasındaki dikkatle koordine edilmiş etkileşime müdahale eder ve çoklu fizyolojik, metabolik ve davranışsal değişiklikler, uyku bozukluğu, sirkadiyen bozulma ve melatonin bozulması ile sonuçlanır. Vardiyalı çalışan milyonlarca insan da bu endojen sirkadiyen ritimlere uymayan yaşam tarzından etkilenen bireyler arasında yer almaktadır (272). Vardiyalı çalışma, sanayileşmeden bu yana giderek daha yaygın hale gelmiştir; işgücünün yaklaşık %10'u, sürekli gece vardiyaları, dönüşümlü vardiyalar ve düzensiz programlar dahil olmak üzere gece çalışmasına maruz kalmıştır (273). Vardiyalı çalışmada bireyler gündüz saatleri dışında uyanık ve aktiftir; değişen uyku ve yeme düzenlerinden muzdariptirler ve geceleri ışığa maruz kalırlar. Bu tür koşullar, iç biyolojik saat ile bir çatışmaya neden olur ve homeostaz kaybını tetikleyen sirkadiyen bozulmayı teşvik eder (30). Ve bu sirkadiyen bozulma, yorgunluk ve kötü

uyku, kaza artışları, gastrointestinal şikayetler, üreme bozuklukları, metabolik bozukluklar, obezite, T2DM, kanser riskinin artması dahil olmak üzere vardiyalı çalışmanın olumsuz sağlık sonuçlarına katkıda bulunabilir (52,55,61,274,275).

Uluslararası Uyku Bozuklukları Sınıflandırması, sürüm 2'ye (ICSD-2) göre, 18 ila 65 yaşları arasındaki gece ve dönüşümlü vardiyalı çalışanların yaklaşık %10'unun teşhis edilebilir bir "vardiyalı çalışma uyku bozukluğuna" sahip olduğu tahmin edilmektedir (275). Sirkadiyen ritim, vardiyalı çalışanlarda görüldüğü gibi uyku-uyanıklık döngüsüne uymadığında, sirkadiyen eşzamansızlık olarak adlandırılan karşıt sinyalleşmeye neden olur. Bu uyumsuzluk, suprakiazmatik çekirdek ağ ritmini ve hormonal salınımı bozarak uyku ve metabolizmada rahatsızlıklara yol açar. Vardiyalı çalışanlar, vardiyalı olmayanlardan daha az uyurlar ve gündüz çalışan meslektaşlarına göre daha yorgun hissettiklerini bildirirler, tüm bunlar sirkadiyen eşzamansızlığın belirtileridir (272,276).

Vardiyalı çalışanlarda idrar 6-sülfatoksimeleatonin toplam 24 saatlik ölçümlerinin yapıldığı bir araştırmada araştırmacılar, tüm çalışanlarda aynı olmakla birlikte toplam melatonin üretiminin azaldığını ve melatonin sentezinin normal uyku-uyanıklık döngüsünün tersine döndüğünü yani melatonin seviyelerinin gündüzleri daha yüksek ve geceleri daha düşük seyrettiğini bulmuştur (277). Melatonin salgısındaki bu değişimler, aslında gece vardiyasında elektrik ışığı tarafından keskin bir şekilde bastırılan epifiz bezinin melatonin salgısının ışık kaynaklı inhibisyonudur. Gece boyunca oküler ışığa maruz kalma melatonin üretimini geçici olarak engeller (269,278) ve melatonin düzeylerinin tepe ve dip düzeylerinde değişikliklere yol açar (272). Geceleri ışığın SCN'de normalde aktif olmayan nöronları aktive etmesi ve melatonin normalde yüksek olduğunda melatonin salgısını inhibe etmesi, gece ışığının güçlü bir sirkadiyen bozucu sinyal olduğunu gösterir (279).

2.13.1. Gece Vardiyası ve Metabolik Bozukluklar

Dünya çapında artan obezite ve metabolik hastalık insidansı nedeniyle, dikkatler risk altındaki bireylere, özellikle vardiyalı çalışanlara ve bozulmuş uyku aktivitesi modellerine maruz kalan gruplara odaklanmıştır (279). Araştırmalar vardiyalı çalışanların metabolik sendrom, obezite, insülin direnci, dislipidemi, kardiyovasküler hastalık, inme ve T2DM gibi hastalıkların insidansında artış olduğunu göstermektedir (272,279). 3 yıllık bir izlemde, gece vardiyasında çalışanlar klinik olarak

sınıflandırılmış ve bozulmuş açlık glukozu veya bozulmuş glukoz toleransı olanların diyabete ilerleme riski, gece çalışmayanlara göre beş kat daha yüksek bulunmuştur (280). Çalışmalar, vardiyalı çalışanların gece geç saatlere doğru artan tüketimle (281,282) birlikte, yüksek enerjili ve yüksek yağlı yiyecekleri gündüz çalışanlara göre daha çok tercih ettiklerini göstermektedir (283,284).

Periferik organlar, değişen glukoz, insülin, sıcaklık ve kortikosteron seviyelerine, işlevlerine ve metabolik dengeye katılımlarına bağlı olarak farklı şekillerde yanıt verir. Bu nedenle, sadece ışık değil gıda alım zamanının da sirkadiyen sistem için güçlü bir sinyal olduğu, beyin ve periferik osilatörlerin yanı sıra davranışları yönlendirdiği gösterilmiştir. Besin zamanı, biyolojik saat tarafından yönlendirilen normal uyku-aktivite döngüsü ile çakışmadığında, besin, kilo alımı, obezite ve metabolik sendrom lehine metabolik etkinliğin düzenlenmesi için SCN tarafından yönlendirilen zamansal sinyallerle içsel bir çatışma yaratır (279). Bu nedenle, öğünleri aktivite döngüleriyle zamanlamanın ve düzenli beslenme düzenini sürdürmenin, obezite ve metabolik sendrom gelişimini azalttığı bulunmuştur (285).

Spesifik olarak, kalorilerinin çoğunu günün erken saatlerinde tüketen kişilerin, diğerlerine göre önemli ölçüde daha fazla kilo verdiği bulunmuştur (286,287). Ayrıca yüksek yağlı diyetlerin de periferik sirkadiyen ritimleri etkilediği ve metabolik bozulmalara yol açtığı bulunmuştur (288). Sirkadiyen bir döngüselliğe sahip olan melatonin, ayrıca glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynar ve gece kemirgenlerinde melatonin tedavisinin, obez farelerde metabolik durumu iyileştirdiği gözlenmiştir (289). Bu işlev, sirkadiyen bozulmadan kaynaklanan düşük melatonin seviyelerinin kısmen metabolik işlev bozukluğunun nedeni olabileceğini düşündürmektedir (279). Bütün bu bulgular, vardiyalı çalışanlar için öğünlerin düzenli alınmasının ve kronobeslenme olarak tanımlanan öğünlerin sirkadiyen ritim ve aktivite döngülerine göre zamanlamasının önemini altını çizmektedir (272).

2.13.2. Gece Vardiyası ve Kanseri Riski

Gece vardiyalı çalışma artık potansiyel bir kanserojen mesleki maruziyet olarak kabul edilmektedir (290). Gece maruz kalan ışık, düşük melatonin üretimi ve sirkadiyen sistemin genetik bileşenlerinin hücre döngüsünde önemli rollere sahip olduğuna dair kanıtlar bu sınıflamayı geçerli kılmaktadır. Son zamanlardaki hayvan çalışmaları sirkadiyen ritim ve kanser insidansı arasındaki bağlantılara ışık tutmuştur.

Sirkadiyen genlerden oluşan birbirine kenetlenmiş geri besleme döngüleri, hücre döngüsünün doğru ilerlemesini sağlar ve hücre döngüsü kontrol noktalarındaki kusurlar, kanser gelişimine yol açan kontrolsüz ve sürekli proliferasyondan sorumlu olabilir. Yapılan genetik temelli çalışmalar, CLOCK ve CRY1 gen polimorfizmlerinin artan meme kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir (291). PER2 mutant farelerin, vahşi tip farelerden daha fazla tükürük bezi hiperplazisi ve daha fazla lenfoma geliştirdiği ve kansere daha yatkın oldukları gözlemlendi (292).

Farelerde SCN yıkımı ile sirkadiyen sistem koordinasyonunun bozulmasının, iki tümör modeli Glasgow osteosarkomu ve Pankreatik adenokarsinomu üzerindeki etkileri incelenmiş ve bu tümörlerde SCN yıkımının malign büyümeyi önemli ölçüde hızlandırdığı tespit edilmiştir (293). Öte yandan 24 saat boyunca ışığa maruz bırakılan dişi sıçanlarda kimyasal kaynaklı oluşturulmuş meme kanserinin önemli ölçüde arttığı ve melatonin tedavisinin meme kanserini keskin bir şekilde azalttığı gözlenmiştir (294). Vardiyalı çalışanlarda yapılan kanser araştırmalarının çoğunda bir risk artışı olduğu saptanmıştır fakat bunun altında yatan ana mekanizma henüz netleşmemiştir. Çoğunlukla gece ışığına maruziyet veya kronik stres sonucu sirkadiyen ritmin ve melatonin sentezinin bozulması buna makul bir açıklama sağlayabilir. Melatonin seviyeleri sadece uyku-uyanıklık döngüsünü düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda tümör hücresi farklılaşmasını, çoğalmasını ve apoptozu etkiler ve spesifik sinyal yollarının modülasyonu yoluyla kanser istilasını etkileyebilir (295). Melatonin aynı zamanda güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücüdür (269). İnsan epidemiyolojik çalışmalarından elde edilen kanıtlar, uzun süre vardiyalı çalışan kadınların, vardiyalı çalışmayanlara göre meme kanseri riskinin arttığını göstermektedir (58,296,297). Mezarlık vardiyasında çalışan kadınların değerlendirildiği başka bir çalışmada ise meme kanseri gece ışığa maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir (298). Başka bir çalışma ise vardiyalı çalışanların prostat kanserinin yakalanma riskindeki artışı incelemiş ve dönüşümlü vardiyalı çalışanların prostat kanseri açısından önemli ölçüde risk altında olduğunu bulmuştur (60).

2.14. Mavi Işık ve Sirkadiyen Ritim

Mavi ışık, görünür ışık spektrumunda en kısa dalga boyuna (380-500 nm) ve en yüksek enerjiye sahip ışık olarak tanımlanır. Başlıca mavi ışık kaynağı güneş ışınlarıdır ancak bilgisayarların, elektronik dizüstü bilgisayarların, akıllı telefonların ve diğer

dijital cihazların ekranları önemli miktarda mavi ışık yaymaktadır. Son zamanlarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte insanların bu ekranlara ve dolayısıyla mavi ışığa maruz kalma süreleri oldukça artmıştır. Suprakiazmatik çekirdeklerde yer alan memelilerdeki endojen sirkadiyen osilatör, retinal ganglion hücrelerinin özel alt kümelerinden çevresel ışık uyarıları alır. İnsan endojen sirkadiyen osilatörü, tamamen kör olan insanlarda bile, oküler ışığa karşı son derece hassastır. Gün içinde mavi ışığa maruz kalma, organizmanın gün boyunca esenliğini, uyanıklığını koruyan ve biyolojik ritimlerinlerin çoğunu dış dünyayla senkronize tutan en güçlü uyaran iken önemliyken, yatmadan hemen önce düşük yoğunluklu mavi ışığa kronik olarak maruz kalmanın uyku kalitesi, sirkadiyen faz ve periyot süreleri üzerinde ciddi etkileri olabilmektedir (299). Yapılan bir çalışmada 460 nm'de (mavi ışık) 6,5 saatlik monokromatik ışığa maruz kalmanın, eşit foton yoğunluğuna sahip 6,5 saatlik 555 nm monokromatik ışığa göre iki kat daha fazla sirkadiyen faz gecikmesine neden olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde, 460 nm monokromatik ışık, 555 nm monokromatik ışığa kıyasla iki kat daha fazla melatonin baskılanmasına neden olduğu ve bunun dalga boyuna ek olarak maruz kalma süresine bağlı olduğu gösterilmiştir (300).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Kimyasallar: Kloroform (% 99,8) (Merck KgaA, Almanya), Aseton (vwr, 20066.330), Asetonitril (Riedel, 34851), n-Bütanol, Orto-fosforik asit (%85) J.T. Baker (Hollanda), Diklorometan (Riedel, 32222), Etanol (İSOLAB, 920026), Hekzan (Riedel, 34859), Metanol (Merck, 106007), İzopropanol, Amonyum hidroksit (Merck), Asetik asit (Honeywell), Fosforik asit (İSOLAB, 959.062.2500).

Reaktif ve diğer materyaller:

Standartlar: Fosfolipid karışımı (P3817-1VL, Sigma-Aldrich, Almanya), L- α -phosphatidic acid sodium salt (P9511-10mg, Sigma-Aldrich, Almanya), 3-sn-fosfaditiletanolamin (P7693-5mg, Sigma-Aldrich, Almanya), Sfingomyelin (S0766-50mg, Sigma-Aldrich, Almanya), Fosfatidilserin (Lectus, Tabİlaç, Türkiye), 18:1 BMP (Bis(monooleoylglycero) phosphate) (857133P, Avanti, ABD), L- α -fosfaditilkolin (P3556-25mg, Sigma-Aldrich, Almanya).

Reaktifler: Dekstran sülfat sodyum tuzu (Alfa AESAR, J63606.14), Magnezyum klorid ($MgCl_2$) (ROTH, KK36.1), Tetrabutilamonyum fosfat monobazik (AFG USA, 5574-97-0), Potasyum asetat (Acros, 220151000), Bakır II sülfat penta hidrat (Sigma-Aldrich, Almanya).

Makine Teçhizat: Soğutmalı Santrifüj: Hettich Universal 320 R (Almanya). Mikrosantrifüj: Netheler-Hinz GmbH (Almanya). Etüv: Binder (ABD). Roller Mikser: Medispec (ABD). Vorteks: Velp Scientifica (İtalya). Su Banyosu: Köttermann Labortechnik (Almanya). pH metre: WTW xylem brand (Almanya). Elisa Reader: Biotek SYNERGY HTX Multi-mode reader (ABD). ELISA Washer: ROBONİK washwell PLATE (İNDİA). HPLC: Agilent 1100G serisi.

3.2. Kontrol ve Hasta Gruplarının Belirlenmesi ve Numunelerin Toplanması

Power analizi sonucunda, serum PLTP, sPLA₂, LCAT, EL, kortizol ve melatonin konsantrasyon oranlarının sağlıklı bireyler ile hasta gruplarının karşılaştırılması için aradaki farklılığın %20-30 fark olacağı öngörüsüyle %80 güç ve %95 güven düzeyinde grup başına çalışmaya alınması gereken minimum kişi sayısı 22 olarak hesaplandı. Bunun sonucunda 18-71 yaş arası 26 sağlıklı birey (kontrol grubu), 25 psöriazis hastası,

25 gece vardiyalı çalışan personel, 23 metformin kullanan prediyabetik/diyabetik hasta ve 23 yeni tanılı T2DM hastası kadın ve erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilecek kişi sayısının belirlenmesinin ardından Malatya Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 17.04.2019 tarihli 2019/143 nolu kararı ile etik kurul onayı alındı.

Metformin grubu için kan numuneleri; Turgut Özal Tıp Merkezi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diyabet Polikliniğine başvuran, en az 3 aydan uzun süreli sadece metformin grubu ilaç kullanan prediyabetik veya diyabetik evrede olan 20-76 yaş arası 23 gönüllü hastadan (12 kadın ve 11 erkek) alındı.

Diyabet grubu için kan numuneleri; Turgut Özal Tıp Merkezi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diyabet Polikliniğine başvuran ve yapılan tetkikler sonucu T2DM tanısı konulan 29-65 yaş arası 23 gönüllü hastadan (5 kadın ve 18 erkek) alındı.

Psöriazis grubu için kan numuneleri; Turgut Özal Tıp Merkezi Dermatoloji Anabilim Dalı Dermatoloji Polikliniğine başvuran psöriazis hastalarından sadece topikal tedavi alan (herhangi bir sistemik tedavi almayan) 18-71 yaş arası 25 gönüllü hastadan (15 kadın ve 10 erkek) alındı.

Vardiya grubu için kan numuneleri; Turgut Özal Tıp Merkezi'nde sadece gece vardiyasında çalışan 33-55 yaş arası 25 gönüllü bireyden (5 kadın ve 20 erkek) alındı.

Kontrol grubu için kan numuneleri de bilinen herhangi bir hastalığı olmayan 25-51 yaş arası 26 gönüllü sağlıklı kişiden (11 kadın ve 15 erkek) alındı. Çalışmaya katılan bireylerin yaş, cinsiyet, VKİ gibi bazı özellikleri, sigara kullanımı, ilaç kullanımı ve varsa ek hastalıkları kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylere gönüllü onam formları okutulup gerekli bilgilendirmeler yapıldıktan sonra her bir bireyden; 4 jelli düz biyokimya tüpüne ve 2 EDTA'lı CBC tüplerine (Becton Dickinson, NJ ABD) kan numunesi alındı. Alınan numuneler; serum, plazma ve eritrositlerine ayrıldı. Çalışmada ayrılan serum ve eritrosit numuneleri kullanıldı. Numuneler metformin grubu için M, diyabet grubu için D, psöriazis grubu için P, vardiya grubu için V, kontrol grubu için K şeklinde kodlandı. Tüm kan numuneleri, Covid-19 pandemisi dolayısıyla 20.02.2020-16.09.2020 tarihleri arasında toplanabildi. Çalışmanın etik kurul onay belgesi (EK2) ve bilgilendirilmiş gönüllü onam formu örneği (EK3) ekler bölümünde verilmiştir.

3.3. Numunelerin Hazırlanışı

PBS çözeltisinin hazırlanışı: 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,44 gr Na₂HPO₄, 0,24 gr KH₂PO₄ tartıldı. 0,8 L distile su eklendi. pH 7-8 olacak şekilde ayarlandıktan sonra son hacim 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti +6 °C'de saklandı.

Buffer çözeltisinin hazırlanışı: 16 mL PBS'ye 484 mL distile su eklendi. Hazırlanan çözelti + 6 °C' de saklandı.

BHT içeren tüplerin hazırlanışı: 1 gr BHT (2,6-di-terciyer-bütül-4-hidroksitoluen) tartıldı, 100 mL etanolde çözüldü. Hazırlanan çözelti +6°C ışık almayacak şekilde saklandı. Eritrosit numunesi konulacak her bir Eppendorf tüpüne kullanılmadan hemen önce 0,1 mL BHT çözeltisi eklendi ve azot gazı altında uçuruldu.

3.3.1. Serumların Hazırlanışı

Hastalardan jelli düz biyokimya tüplerine alınan kan numuneleri, 1500 x g'de 10 dakika boyunca 15 °C santrifüj edildi. Ayrılan serumlar, önceden hasta bilgileri içeren Eppendorf tüplere alındı, analiz süresine kadar -80°C'de saklandı. Melatonin çalışılacak serumlar, ışık görmeyecek şekilde önceden alüminyum folyo sarılan Eppendorf tüplere alındı.

3.3.2. Serum HDL İzolasyonu

Yöntemin prensipi, polianyon ve divalent katyonlarla lipoprotein presipitasyonuna dayanmaktadır. Polianyon-divalent katyonlar (Dekstran sülfat – magnezyum klorür) lipidden zengin büyük plazma lipoproteinlerinin (VLDL-IDL-LDL) üzerindeki yüklü gruplar ile çözünmez kompleksler oluşturmaktadır. Bu kompleksler daha sonra düşük devirli santrifüj ile çöktürüldüklerinde süpernatant fraksiyonu HDL lipoproteinlerini içermektedir. Hem HDL-K hem de HDL fosfolipid analizleri bu fraksiyonda gerçekleştirildi.

Yapılışı: Bir mL seruma 100µL 10g/L dekstran sülfat (50 µL) ve 500 mM MgCl₂ (50 µL) içeren karışımdan eklendi ve 10 sn vortekslendi. On dakika oda ısısında bekletildikten sonra 1500xg'de 30 dakika süre ile santrifüj edilerek plazma VLDL-IDL-LDL fraksiyonu çöktürüldü. Süpernatant fraksiyonunda HDL-K ve fosfolipid analizi gerçekleştirildi (301).

3.3.3. Eritrosit Süspansiyonu Hazırlanışı

Kan numuneleri kan alımından hemen sonra 1500xg'de 7 dakika boyunca 15°C santrifüj (Hettich/Almanya) edildi. Santrifüj sonunda üstte kalan plazma, önceden hasta bilgileri yazılmış yeni Eppendorf tüplerine (ISOLAB Mikrosantrifüj tüpü 2 mL'lik, Almanya) alındı. Her bir Eppendorf tüpünde 1 mL plazma numunesi olacak şekilde numuneler eklendi.

Altta kalan eritrositlere önceden oda ısısına getirilmiş 2 mL 9,88 gr/L fosfat buffer solüsyonu (PBS) eklendi. Ardından 1500xg'de 10 dakika boyunca 15°C santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant döküldü, altta kalan eritrositlerden her bir Eppendorf tüpüne 0,1 mL alındı ve üzerine 1,9 mL buffer çözeltisi eklendi. 10 sn vortekslendi. Mikrosantrifüjde 15000 rpm'de 15 dk 0°C santrifüj edildikten sonra üstte kalan faz ayrılıp atıldı. Tekrar her bir Eppendorf tüpüne 1,9 mL buffer çözeltisi eklendi. 10 sn süre ile vortekslendi. Mikrosantrifüjde 15000 rpm'de 15 dk 0°C santrifüj edildikten sonra üstte kalan faz ayrılıp atıldı. Altta kalan eritrosit fazı alındı, önceden 1 mg BHT (%99 saflıkta Sigma-Aldrich, Almanya) içeren hasta bilgileri yazılmış yeni Eppendorf tüpüne eklendi. Hazırlanan numuneler analiz süresine kadar -80°C de saklandı (302). Toplanan her bir kan numunesi için aynı işlemler tekrarlandı.

3.3.4. Eritrosit, Serum ve HDL Süpernatant Lipid Ekstraksiyonu

Eritrosit, serum ve HDL fraksiyonunda lipid ekstraksiyonu Bligh and Dyer (303) metoduna göre gerçekleştirildi. Hazırlanan eritrosit süspansiyonları, serum ve HDL fraksiyonu -80 °C muhafaza edildi ve analizden hemen önce oda ısısına getirildi.

Eritrosit lipid ekstraksiyonu için öncelikle çözülen eritrosit süspansiyonundan 1 mL alındı ve 10 x 1,5 vida kapaklı cam tüpe pipetlendi. Üzerine 3,75 mL kloroform / metanol (1:2, v/v) eklendi, tüpün ağzı teflon kapak ile kapatıldı ve 10 dk boyunca vortekslendi. Sonra üzerine 1,25 mL kloroform eklenip 1dk vortekslendi. Ardından 1,25 mL distile su eklenip 1 dk daha vortekslendikten sonra 4 saat oda ısısında bekletildi. 1500xg'de 10 dk boyunca 22°C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün içerisinde üç faz gözlemlendi. En üstte metanol ve su fazı, ortada proteinden zengin bir tabaka ve en altta da kloroform fazı gözlemlendi. En üst faz pipetle alınıp dışarı atıldı. İki faz arasında bulunan proteinden zengin tabaka ise dikkatlice delinerek alttaki kloroform faz alındı ve temiz bir vida kapaklı cam tüpe aktarıldı. Cam tüpe alınmış kloroform fazı azot gazı altında uçuruldu. Aynı işlem tüm numuneler için tekrarlandı. Hazırlanan ekstraksiyon

üzerine 0,2 mL kloroform eklenerek +4°C analiz edilinceye kadar muhafaza edildi. Serum ve HDL numuneleri için de tüm metod aynı şekilde tekrarlandı. Tüm numuneler için aynı işlemler tekrarlandı ve +4°C de saklandı.

3.5. Melatonin Analizi

Serum Melatonin analizi ELISA yöntemiyle Andygene Human Melatonin ELISA (Andygene AD8332 Hu, USA) markalı kit kullanılarak Sandviç-ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Mikroelisa stripplate kuyucuklara insan melatoninine spesifik anti-human melatonin antikoru ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikroelisa stripplate kuyucuklarına eklenerek spesifik antikora birleştirildi. Numunedeki ve standarttaki melatonin, kuyucuklara adsorbe olmuş antikora bağlanmaktadır. Ardından yıkama işlemiyle bağlanmamış antikolar uzaklaştırıldı, ortama Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz eklenir ve bu kompleks anti-human melatonin antikoru ile bağlanır. Serbest bileşenler yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Ortama substrat ve renk reaktifi eklendi. Reaksiyon ortama stop solusyonu ilavesiyle sonlandırıldı ve oluşan renkli reaktif, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optik dansite değeri, melatonin konsantrasyonu ile orantılıdır. Melatonin düzeyi tayini için; 2,5, 5, 10, 20, 30 ng/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin optik dansitesi, standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki melatonin konsantrasyonu hesaplandı.

3.6. PLTP Analizi

Serum PLTP analizi, Andygene Human PLTP ELISA (Andygene AD8193 Hu, USA) markalı kit kullanılarak kantitatif sandviç enzim bağlı immünoassay (ELISA) yöntemiyle gerçekleştirildi. Yöntemin prensibinde mikroelisa stripplate kuyucuklara insan PLTP molekülüne karşı geliştirilmiş spesifik bir antikor ile kaplanmıştır. Standartlar ve numunelerin ELISA kuyucuklarına eklenmesi ile ortamda bulunan PLTP molekülleri sabit antikora bağlanmaktadır. Yıkama ile numunede bağlanmayan komponentler uzaklaştırıldı. Yıkama sonrası biyotinlenmiş serbest antikolar eklendi. İkinci yıkama işlemi ile ortamdan fazla antikolar uzaklaştırıldıktan sonra Avidinle konjuge Horseradish Peroksidaz bağlı konjugat eklendi. İnkübasyondan sonra kuyucuklar tekrar yıkandı ve ortama peroksidazın substratı olan Tetrametilbenzidin eklendi. Son basamakta kuyucuklara eklenen stop solusyonu ile reaksiyon durduruldu. Oluşan sarı renkli reaktif, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü ve

absorbans elde edildi. Absorbans değeri, PLTP konsantrasyonu ile orantılıdır. PLTP düzeyi tayini için; 100, 200, 400, 800 ve 1200 ng/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin absorbansı, standart eğri ile karşılaştırılarak numunelerdeki PLTP konsantrasyonu hesaplandı.

3.7. sPLA₂ Analizi

Serum sPLA₂ analizi ELISA yöntemiyle Andygene Human sPLA₂ ELISA (Andygene AD12021 Hu, USA) markalı kit kullanılarak Sandviç-ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Mikroelisa stripplate kuyucuklara insan sPLA₂ spesifik anti-human melatonin antikoru ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikroelisa stripplate kuyucuklarına eklenerek spesifik antikorla birleştirildi. Numunedeki ve standarttaki sPLA₂ kuyucuklara adsorbe olmuş antikorlara bağlanmaktadır. Ardından yıkama işlemiyle bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı, ortama Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz eklendi ve bu kompleks anti-human sPLA₂ antikorlarına bağlanmaktadır. Serbest bileşenler yıkama ile uzaklaştırıldı. Ortama substrat ve renk reaktifi eklendi. Reaksiyon ortama asit eklenmesiyle sonlandırıldı ve oluşan renkli reaktif, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optik dansite değeri, sPLA₂ konsantrasyonu ile orantılıdır. sPLA₂ düzeyi tayini için; 10, 20, 40, 80, 160, 240 ve 360 ng/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin optik dansite değeri, standart eğri ile karşılaştırılarak numunelerdeki sPLA₂ konsantrasyonu hesaplandı.

3.8. LCAT Analizi

Serum LCAT analizi ELISA yöntemiyle Andygene Human LCAT ELISA (Andygene AD9164 Hu, USA) markalı kit kullanılarak Sandviç-ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Mikroelisa stripplate kuyucuklara insan LCAT spesifik anti-human melatonin antikoru ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikroelisa stripplate kuyucuklarına eklenerek spesifik antikorla birleştirildi. Numunedeki ve standarttaki LCAT kuyucuklara adsorbe olmuş antikorlara bağlanmaktadır. Ardından yıkama işlemiyle bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı, ortama Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz eklendi ve bu kompleks anti-human LCAT antikorlarına bağlanmaktadır. Serbest bileşenler yıkama ile uzaklaştırıldı. Ortama substrat ve renk reaktifi eklendi. Reaksiyon ortama asit eklenmesiyle sonlandırıldı ve oluşan renkli reaktif, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak

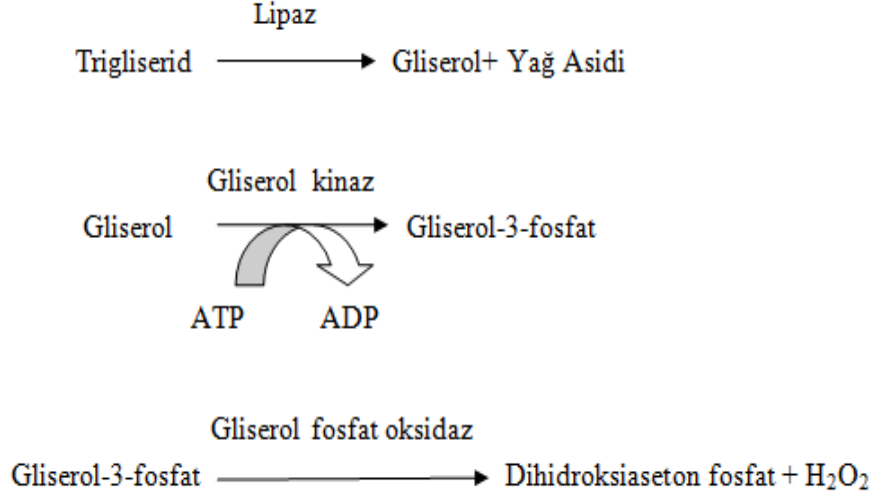
ölçüldü. Optik dansite değeri, LCAT konsantrasyonu ile orantılıdır. LCAT düzeyi tayini için; 125, 250, 500, 1000, 2000, 3000 ve 4500 ng/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin Optik dansite değeri, standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki LCAT konsantrasyonu hesaplandı.

3.9. EL Analizi

Serum EL analizi ELISA yöntemiyle Andygene Human EL ELISA (Andygene AD8541 Hu, USA) markalı kit kullanılarak Sandviç-ELISA yöntemiyle gerçekleştirildi. Mikroelisa stripplate kuyucuklara insan EL spesifik anti-human EL antikorları ile önceden kaplanmıştır. Standartlar ve numuneler, uygun mikroelisa stripplate kuyucuklarına eklenerek spesifik antikorla birleştirildi. Numunedeki ve standarttaki EL kuyucuklara adsorbe olmuş antikorlara bağlanmaktadır. Ardından yıkama işlemiyle bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı, ortama Avidin ile konjuge horseradish peroksidaz eklendi ve bu kompleks anti-human EL antikorlarına bağlanmaktadır. Serbest bileşenler yıkama ile uzaklaştırıldı. Ortama substrat ve renk reaktifi eklendi. Reaksiyon ortama asit eklenmesiyle sonlandırıldı ve oluşan renkli reaktif, 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Optik dansite değeri, EL konsantrasyonu ile orantılıdır. EL düzeyi tayini için; 7,5, 15, 30, 60, 120, 180 ve 270 ng/L konsantrasyonlarında standartlar hazırlanarak standart grafiği oluşturuldu. Numunelerin optik dansite değeri, standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki EL konsantrasyonu hesaplandı.

3.10. Trigliserid Analizi

İnsan serum numunelerinde Trigliserid düzeyleri Abbott Architect c16000 (IL, ABD) markalı cihazda Abbott Trigliserid (IL, ABD) hazır kiti kullanılarak enzimatik olarak spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. Trigliserid analitik metodolojisi Fossati ve ark. ile McGoowan ve ark. tarafından açıklanan reaksiyonu temel almaktadır. Bu reaksiyona göre:



Peroksidaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonla H₂O₂, 4-aminoantiprin ve 4-klorofenol ile reaksiyona girerek kırmızı renkli kinonimin boyası oluşur, oluşan renkli çözeltinin 660 nm'de absorbanşı ölçülür. Bu boyanın absorbanşı, örnekteki trigliserid konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Serum trigliserid konsantrasyonunun tayini için 94 mg/dL ve 450 mg/dL konsantrasyonunda iki hazır standart solusyonu (MCC, Architect, ABD) kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak örneklerin trigliserid miktarları hesaplandı.

3.11. HDL-K Analizi

Analizler, Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Laboratuvarında HDL Direkt Kolesterol kitiyle otoanalizörlerde (Abbott Architect C 16000, Abbott Park, IL, USA) yapıldı. Analizler, numunenin alındığı gün gerçekleştirildi. Analizlerin prensibi: Magnezyum iyonları eklendikten sonra, dekstran sülfat LDL, VLDL ve şilomikronlar ile suda çözünebilir seçici kompleks oluşturur. HDL-K'nın kolesterol miktarı, kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz tarafından enzimatik olarak test edilebilir. Kolesterol esterleri kolesterol esteraz tarafından serbest kolesterol ve yağ asitlerine kantitatif olarak yıkılır. İnsan serumundaki HDL-K özel deterjanlarla çözünür ve renkli reaksiyon oluşturur. Bunlar: kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz, peroksidaz. Çünkü HDL olmayan lipoproteinler, örneğin şilomikronlar, LDL, VLDL deterjanlar tarafından yüzeylerinden inhibe edilir, içlerindeki kolesterol enzimle etkileşmez. Endpoint reaksiyon sonunda serumda oluşan rengin absorbanşı, 604-700 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak okutulur ve HDL-K konsantrasyonları elde edilir.

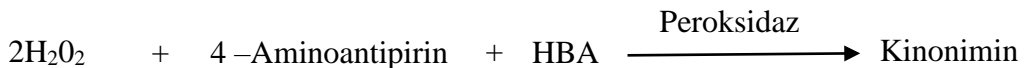
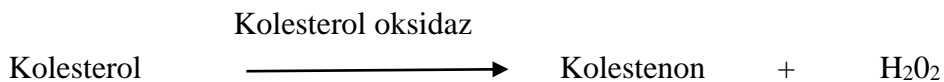
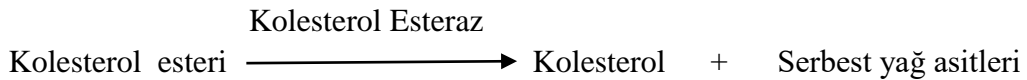
3.12. Kortizol Analizi

Analizler, Turgut Özal Tıp Merkezi Merkez Laboratuvarında kortizol testiyle otoanalizörlerde ADVIA Centaur XPT cihazda (Siemens Medical Solutions, USA) yapılmıştır. Analizler, numunenin alındığı gün gerçekleştirildi. Kortizol testi, doğrudan kemilüminesans teknolojisinin kullanıldığı yarışmalı bir immünotesttir. Hasta numunesindeki kortizol, katı fazdaki poliklonal tavşan anti-kortizol antikoruyla bağlanmak için Lite Reaktifindeki akridinyum ester işaretli kortizolle yarışır. Poliklonal tavşan anti-kortizol antikoru, katı fazdaki paramanyetik partiküllere kovalent bağlı monoklonal fare anti-tavşan antikoruyla bağlanır. Sistem otomatik olarak aşağıdaki işlemleri gerçekleştirir: 20 µl örneği bir küvete dağıtır. 50 µl Lite Reaktif ve 250 µl katı faz hazırlar ve 37°C'de 5 dakika boyunca inkübe eder. Küvetleri ayırır, aspire eder ve reaktif suyu ile yıkar. Kemilüminesans reaksiyonu başlatmak için her bir Asit Reaktif ve Baz Reaktifinden 300 µl hazırlar. Sistem sonuçları belirlenen seçeneğe göre rapor eder. Hasta örneğinde bulunan kortizol miktarı ile sistem tarafından belirlenen bağıl ışık birimleri arasında ters bir ilişki mevcuttur.

3.13. Total Kolesterol Analizi

İnsan serum numunelerinde Total Kolesterol düzeyleri Abbott Architect c16000 (IL, ABD) markalı cihazda Abbott Kolesterol (IL, ABD) hazır kiti kullanılarak enzimatik olarak spektrofotometrik yöntemle analiz edildi. Analizler, numunenin alındığı gün gerçekleştirilmiştir. Analizlerin prensibi :

Kolesterol esterleri, kolesterol esterase tarafından kolesterol ve serbest yağ asitlerine enzimatik olarak hidroliz edilir. Serbest kolesterol, daha sonra kolesterol oksidaz tarafından kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksit oksitlenir. Hidrojen peroksit, hidroksibenzoik asit (HBA) ve 4-aminoantipirin ile birleşerek, 500 nm'de ölçülen bir kromofor (Kinonimin boyası) oluşturur.



3.14. VLDL-K Analizi

Friedewald formülüne göre serumda ölçülen trigliserid düzeylerinin 1/5'i hesaplanarak VLDL-K düzeyleri elde edilmiştir.

$$\text{VLDL-K} = \text{Trigliserid} / 5$$

3.15. LDL-K Analizi

LDL-K düzeyleri, Trigliserid düzeyleri < 400 mg/dL olan katılımcılar için Friedewald formülü kullanılarak hesaplandı. Friedewald formülü, Total kolesterol, Trigliserid ve HDL-K düzeylerini kullanan bir LDL-K düzeyi tahminidir.

$$\text{LDL-K} = \text{Total kolesterol} - [\text{HDL-K} + (\text{TG}/5)]$$

3.16. Fosfolipid Analizi

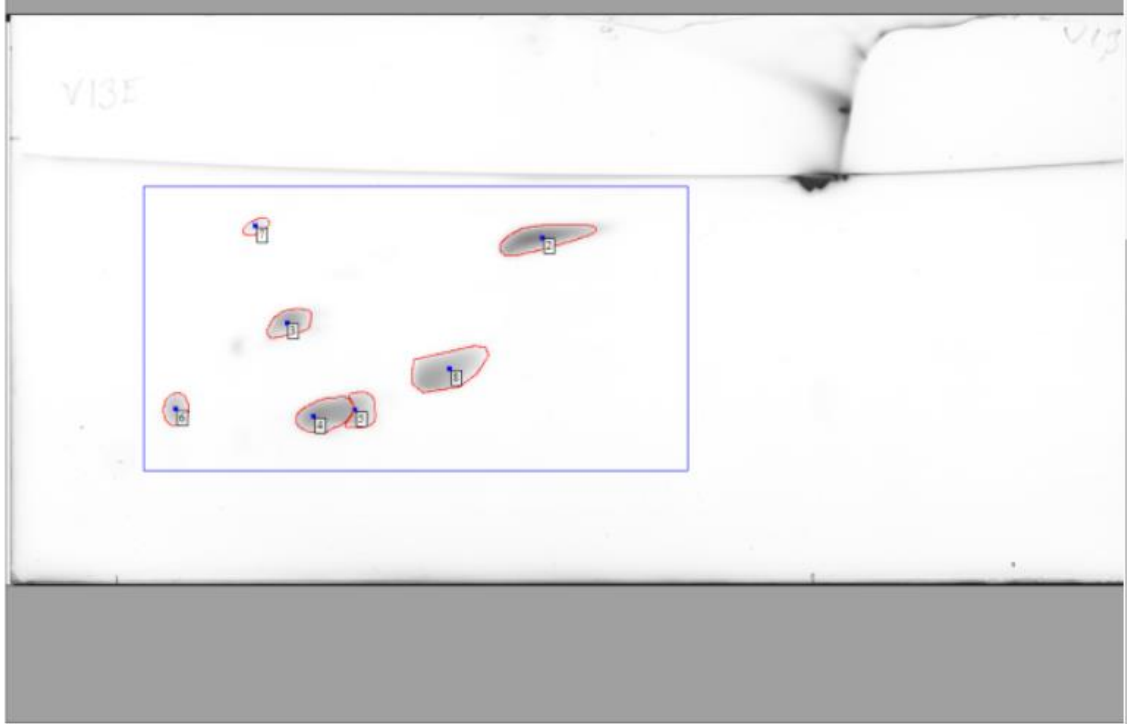
3.16.1. HPTLC metodu

Yöntem, sabit bir faz üzerine uygulanmış numune bileşenlerinin organik akıcı maddeler yardımıyla birbirinden ayrılması esasına dayanmaktadır. Ayırım, aşağıdan yukarıya doğru hareketli fazın kılcallık etkisiyle sabit faz üzerinde bulunan numune bileşenlerinin birbirinden ayrılması ile olmaktadır. Yöntemde sabit faz, farklı boyutlardaki cam plakalar üzerine, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban (silika) jel maddeden oluşur. Hareketli faz ise ayrılacak maddelerin özelliğine göre seçilen bir veya birden fazla çözücü karışımlarından oluşmaktadır. Sabit faz polar, hareketli faz apolardır. Dolayısıyla karışımdaki polar maddeler sabit faza tutunur ve daha yavaş hareket eder. Apolar maddeler ise hareketli faz apolar olduğundan daha hızlı hareket ederler.

HPTLC fosfolipid analizleri yapılmak üzere kontrol ve psöriazis grubundan 9, diyabet, metformin ve vardiya grubundan 10 numune seçilmiştir. Seçilen her numunenin serum, HDL süpernatantı ve eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonları Bligh Dyer metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Lipid ekstraksiyonu sonucu elde edilen numuneler (eritrosit, serum ve HDL) ve fosfolipid standartları iki boyutlu HPTLC yöntemi ile ayrıldı. Ayırma işlemi için sabit faz olarak 20×10 cm silika jel G kaplı HPTLC cam plakalar, birinci hareketli faz olarak kloroform/metanol/ %25 amonyum hidroksit (90:54:11; v/v/v), 90° çevrilerek ikinci kez tatbik edilen ikinci hareketli faz olarak kloroform/metanol/asetik asit/su (90:40:12:2) kullanıldı (304).

Analiz öncesi kullanılacak plakalar, önceden ısıtılmış etüv içerisinde 110°C'de 1 saat süre ile aktive edildi. Aktive edilen plakalara numune ve standartların uygulanacağı noktalar (sağ alt köşeden 2 cm) belirlendi. Belirlenen her bir noktaya standart ve numunelerden 5 µL'lik 4 damla toplamda 20 µL olacak şekilde numune veya standartlar uygulandı. Hazırlanan plakalar içerisinde birinci hareketli faz bulunan iki oluklu kromatografi tankına yerleştirildi yürütme işlemi başlatıldı. Yürütme işlemi bitince plakalar tanktan çıkarılarak saç kurutma makinesiyle 20 dakika boyunca kurutuldu. Tamamen kurutulan plakalar içerisinde ikinci hareketli faz bulunan kromatografi tankına numune yükleme noktasının bulunduğu noktadan 90° derece döndürülerek yerleştirildi. Yürütme işlemi biten plakalar tanktan çıkarılarak saç kurutma makinesiyle 20 dakika boyunca kurutuldu. Yürütme işlemi biten ve kurutulan plakalar %8'lik fosforik asitte hazırlanmış %10'luk bakır II sülfat çözeltisi içerisine daldırılarak boyanması sağlandı. Boyanan plakalar 180°C'de etüv içerisinde 20 dakika süre ile kurutuldu. HPTLC ile ayrılıp boyama sonucu görünür hale gelen lipid spotlarının olduğu plakalar tarayıcı (Canon 5600F) ile tarandı. Taranan plakalar 600 DPI ve JPG dosyası formatında bilgisayar ortamında kaydedildi. Her bir lipid bantının yoğunluk/miktar tayini fotodansitometrik olarak yapıldı (Sweday Just TLC, İsveç). Elde edilen değerlerle her bir lipid bantının miktarı belirlendi.

Uygulama boyunca her bir plakaya sadece bir numune veya standart numunesi uygulandı. Birinci yürütmede tank içerisine dikey yönde 4 plaka, ikinci yürütmede yatay yönde 2 plaka yerleştirildi. Yürütme mesafesi, birinci hareketli fazda 14 cm, ikinci hareketli fazda 8 cm olarak uygulandı. Çalışma boyunca hareketli fazın hazırlanması, yürütme işlemleri, kurutma işlemi ve boyama işlemlerinin tamamı, oda ısısında ve çeker ocak içinde yapıldı. Her bir numune veya standart için prosedür aynı şekilde tekrarlandı.



Spot Data

ID	Series	Rf	X	Y	Area	Volume	Notes
2	None	0,821	2200	916	14164	9,97	PE
3	None	0,521	1150	1268	7210	3,35	PI+PS
4	None	0,191	1258	1654	11374	7,5	SM1
5	None	0,214	1430	1628	6157	2,56	SM2
6	None	0,216	694	1624	5113	1,8	PS
7	None	0,862	1022	868	2397	0,37	PA
8	None	0,359	1818	1458	18397	9,43	PC

Şekil 3.1. HPTC’de lipid spotlarının fotodansitometrik analizi

Boyanın Hazırlanışı: %85’lik fosforik asitten 9,4 mL alınıp üzerine 90,6 mL distile su eklenerek %8’lik fosforik asit hazırlandı. 15,6 gr bakır II sülfat-penta hidrat tartıldı ve 100 mL %8’lik fosforik asit içerisinde çözülerek %10’luk (w/v) bakır II sülfat çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan çözelti, ışık almayacak şekilde cam bir şişenin içerisinde saklandı.

Fosfolipid Standartların Hazırlanışı:

Fosfatidilkolin standardı: 25 mg L- α -fosfatidilkolin (P3556-25mg, Sigma-Aldrich, Almanya) 1 mL kloformda çözüldü (0,025mg/ μ L). Hazırlanan stok çözelti 1:10 oranında kloroformda seyreltilerek kullanıldı.

Fosfaditiletanolamin standardı: 5 mg 3-sn-fosfaditiletanolamin (P7693-5mg Sigma-Aldrich Almanya) 1 mL kloroformda çözüldü (0,005mg/μL). Hazırlanan stok çözelti 1:1 oranında kloroformda seyreltilerek kullanıldı.

Lizofosfaditiletanolamin standardı: 5 mg 3-sn-lizofosfaditiletanolamin (L4754-5mg, Sigma-Aldrich, Almanya) 1,5 mL kloroformda çözüldü (0.003 mg/μL).

Fosfaditilserin standardı: 1 kapsül (75 mg) fosfatidilserin (Lectus, Tablaç, Türkiye) 10 mL kloroformda çözüldü.

Fosfaditik asit: 10 mg 3-sn-fosfaditik asit (P9511-10mg, Sigma-Aldrich, Almanya) 5 mL kloroformda çözüldü.

Sfingomiyelin standardı: 50 mg sfingomiyelin (S0766-50mg, Sigma-Aldrich, Almanya) 10 mL kloroformda çözüldü. Sfingomyelin yeterince çözünmediğinden azot gazı altında uçurularak çözücü uzaklaştırıldı. Kloroform/metanol/su (100:2:0.1) karışımında yeniden çözüldü.

Fosfolipid karışımı 1: 2 mL fosfolipid karışımı (P3817-1VL Sigma-Aldrich, Almanya) kloroformda çözünmüş halde kullanıldı. Karışım içeriği: L-α-Lizofosfaditilkolin, 3 mg/mL, L-α-Fosfaditilkolin 1,5 mg/mL, L-α-Fosfaditiletanolamin, 1,2 mg/mL, L-α-Fosfaditilinozitol 9 mg/mL.

Fosfolipid karışımı 2: 10 mg fosfolipid karışımı (690050P, Avanti, USA) 1 mL kloroformda çözüldü. Karışım içeriği: Lizofosfaditilkolin, 0,7 mg/mL, Fosfaditilkolin 3,8 mg/mL, L-α-Fosfaditiletanolamin, 3 mg/mL, Fosfaditilinozitol 1,8 mg/mL, Fosfaditik asit 0,7 mg/mL.

İnternal standart: 5 mg 18:1 bis(monooleoylglycero)phosphate (857133P, Avanti, ABD) 1 mL kloroformda çözüldü.

Tüm standartlar kullanılmadan önce -20 °C'de muhafaza edildi. Çözüldükten sonra porsiyonlara bölünerek kullanılacak olanlar +4 °C'de, kullanılmayacak olanlar -20°C'de muhafaza edildi.

3.16.2. HPLC Metodu

Bu teknikte pompalar ile pompalanan yüksek basınçlı hareketli faz aracılığıyla taşınan analitler, kromatografik kolona ulaşır. Kolona gelen karışımın bileşenleri kolon

partikülleri olan farklı derecedeki kimyasal veya fiziksel etkileşimden dolayı birbirinden ayrılırlar. Bu karışımları taşıyan sıvılar genellikle yüksek basınç altındadırlar ve genelde birkaç solventin bileşiminden oluşurlar. Bu çözümler genel olarak su, asetonitril, metanoldur. Analitleri taşıyan bu sıvıya mobil faz denir. Mobil fazın genel bileşimi (yani hangi solventlerden oluştuğu) ve sıcaklığı analitlerin ayrışma prosesinde önemli bir rol oynar. Çünkü kolon ve analitler arasında fiziksel etkileşimler (Hidrofobik, dipol-dipol ve iyonik) vardır. HPLC (Yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazları tipik olarak degasser, enjektör, pompa, kolon ve detektörden oluşur. Enjektörün numuneyi mobil faza enjekte etmesiyle, analitler kolona taşınır. Kolon da içindeki sabit faz yardımıyla bu analitleri ayrıştırarak detektöre gönderir. Detektöre gelen analitler de miktarlarına ve özelliklerine göre sinyaller üretir. Bu sinyaller de veri analizi programlarıyla analizlenir. Bu veri analizi sayesinde kalitatif ve kantitatif analiz tamamlanmış olur.

HPLC fosfolipid analizleri yapılmak üzere kontrol ve hasta gruplarından 6'şar numune seçildi. Seçilen her numunenin serum, HDL süpernatantı ve eritrosit süspansiyonunun lipid ekstraksiyonları Bligh Dyer metoduna göre gerçekleştirildi. Eritrosit membranı, serum ve HDL fosfolipid analizleri tayini İnönü Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı araştırma laboratuvarında HPLC yöntemiyle gerçekleştirildi.

Mobil Faz Hazırlanışı: Asetonitril/Metanol/Fosforik asit (130:5:1,5 v/v/v) karışımı hazırlandı. Mobil fazlar günlük olarak hazırlandı.

Enstrümental Analiz

Çalışmamızda serum numunelerinin fosfolipid tayininde ters faz HPLC yöntemi kullanıldı. Analizde Agilent 1100G serisi HPLC cihazı, analitik kolon olarak 250 x 4,6 mm boyutlarında Develosil silika içeren 60 Å, 5 µm partikül büyüklüğünde, normal faz kolon (S100546250W, Japonya) ve diyot dizisi dedektörü kullanıldı. Numuneler 20 µL hacimde, 0,6 mL/dk akış hızında, kolon 50°C sıcaklıkta, mobil faz izokratik sistemde, dalga boyu 203 nm olacak şekilde ayarlandı.

3.17. İstatistiksel Analizler

Çalışmamızda Melatonin, sPLA₂, LCAT, EL, PLTP, Melatonin, Kortizol sonuçları, açlık kan şekeri (AKŞ), HDL-K, LDL-K, VLDL-K, Total-K, TG ve HPLC

analiziyle elde edilen fosfolipid değerlerine ait verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım varsayımı sağlanmadığı için grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Veri dağılımları medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi. Tüm testlerde iki yönlü anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi. Analizlerde, İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı tarafından geliştirilen “Kruskal-Wallis” (305) web tabanlı uygulaması kullanılmıştır.

HPTLC yöntemiyle fosfolipid analizleri, gerekli malzemeler yetersiz sayıda olduğundan kontrol ve hasta gruplarının tamamında yapılamamıştır. Bu nedenle HPTLC yöntemiyle elde edilen fosfolipid değerlerinde istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

4. BULGULAR

4.1. Kontrol ve Hasta Gruplarına Ait Bazı Özelliklerin Karşılaştırılması

Çalışma, herhangi ek bir hastalığı olmayan 26 kontrol grubu, T2DM tanısı yeni konmuş 23 hastadan oluşan diyabet grubu, metformin kullanan prediyabetik veya diyabetik 23 hastadan oluşan metformin grubu, sistemik ilaç kullanımı olmayan psöriazis tanılı 25 hastadan oluşan psöriazis grubu ve gece vardiyasında çalışan 25 hastane personelinden oluşan vardiya grubu olmak üzere 5 gruptan oluşmaktadır.

Kontrol ve hasta gruplarına ait cinsiyet, yaş, VKİ, sigara ve ilaç kullanımı istatistiksel olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.1.). Çalışmaya katılan kontrol ve hasta gruplarına ait özellikler karşılaştırıldığında cinsiyet bakımından diyabet ve vardiya grubunda erkeklerin sayısı daha fazlaydı (Tablo 4.1.). Grupların sigara kullanımı değerlendirildiğinde vardiya grubunda sigara kullanımı fazla iken, diğer gruplarda sigara kullanmayanların oranı daha fazla bulundu. Grupların ilaç kullanımı incelendiğinde ise kontrol grubunda ilaç kullanan yok iken, diyabet grubunda 6 kişi, psöriazis ve vardiya grubunda 7'şer kişi ilaç kullanıyordu. Metformin grubunun tamamı (n=23), Metformin preparatının farklı ticari formlarını almaktaydı. Yaş ortalamalarına bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,001$) ve psöriazis ve kontrol grubunun diğer gruplara göre daha genç bireylerden oluştuğu ve diyabet ve metformin gruplarının ise diğer gruplara göre daha ileri yaşa sahip bireylerden oluştuğu belirlendi. VKİ değerlerine göre diyabet ve metformin gruplarının VKİ değerleri kontrol, psöriazis ve vardiya grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekti ($p=0,002$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Kontrol ve hasta gruplarına ait bazı demografik veriler

Değişkenler**	Gruplar*										p	
	Kontrol		Diyabet		Metformin		Psöriazis		Vardiya			
	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)		
Yaş	26	38,5 ^{b,c} (25-51)	23	50 ^{a,d,e} (29-67)	23	48 ^{a,d,e} (20-76)	25	31 ^{b,c,e} (18-71)	25	40 ^{b,c,d} (33-55)	<0,001*	
VKİ	26	26,2 ^{b,c} (22,1-34,5)	20	30,2 ^{a,d,e} (21,5-40,5)	23	30,1 ^{a,d,e} (20,9-39,2)	25	25,5 ^{b,c} (18,4-38,7)	25	26,8 ^{b,c} (17,9-33,7)	0,002*	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	p	
Sigara kullanımı	yok	17	65,4	11	52,4	15	65,2	14	56	10	40	0,351
	var	9	34,6	10	47,6	8	34,8	11	44	15	60	
Cinsiyet	Erkek	15 ^{a,b}	57,7 ^{a,b}	18 ^{a,b}	78,3 ^{a,b}	11 ^{a,b}	47,8 ^{a,b}	10 ^b	40 ^b	20 ^a	80 ^a	0,011*
	Kadın	11 ^{a,b}	42,3 ^{a,b}	5 ^{a,b}	21,7 ^{a,b}	12 ^{a,b}	52,2 ^{a,b}	15 ^b	60 ^b	5 ^a	20 ^a	
İlaç kullanımı	yok	26 ^a	100 ^a	17 ^a	73,9 ^a	0 ^b	0 ^b	18 ^a	72 ^a	18 ^a	72 ^a	<0,001*
	var	0 ^a	0 ^a	6 ^a	26,1 ^a	23 ^b	100 ^b	7 ^a	28 ^a	7 ^a	28 ^a	

VKİ: Vücut kitle indeksi, * : a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. ** : Değişkenler, 'medyan (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir, $p < 0,05$.

4.2. Serum Lipid ve Açlık Kan Şekeri Düzeyleri

Serum AKŞ düzeyleri diyabet ve metformin grubunda diğer gruplara göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,001$). Serum HDL-K düzeyleri diyabet ve vardiya grubunun kontrol ve psöriazis gruplarına göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,025$). Ayrıca grupların tamamında HDL-K düzeylerinin normal fizyolojik düzeylere göre düşük bir seyir görülmektedir. Serum TG düzeyleri, vardiya grubunda kontrol ve psöriazis grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Diyabet ve metformin gruplarının TG düzeyleri incelendiğinde psöriazis grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Psöriazis grubunun TG düzeyleri, diyabet, metformin ve vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,009$). Serum VLDL-K düzeyleri, vardiya grubunda kontrol ve psöriazis grubuna göre anlamlı derecede yüksek, psöriazis grubunda ise diyabet, metformin ve vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,010$). Serum total kolesterol ve LDL-K düzeylerinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (sırayla $p=0,152$; $p=0,307$) (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum AKŞ ve lipid düzeyleri

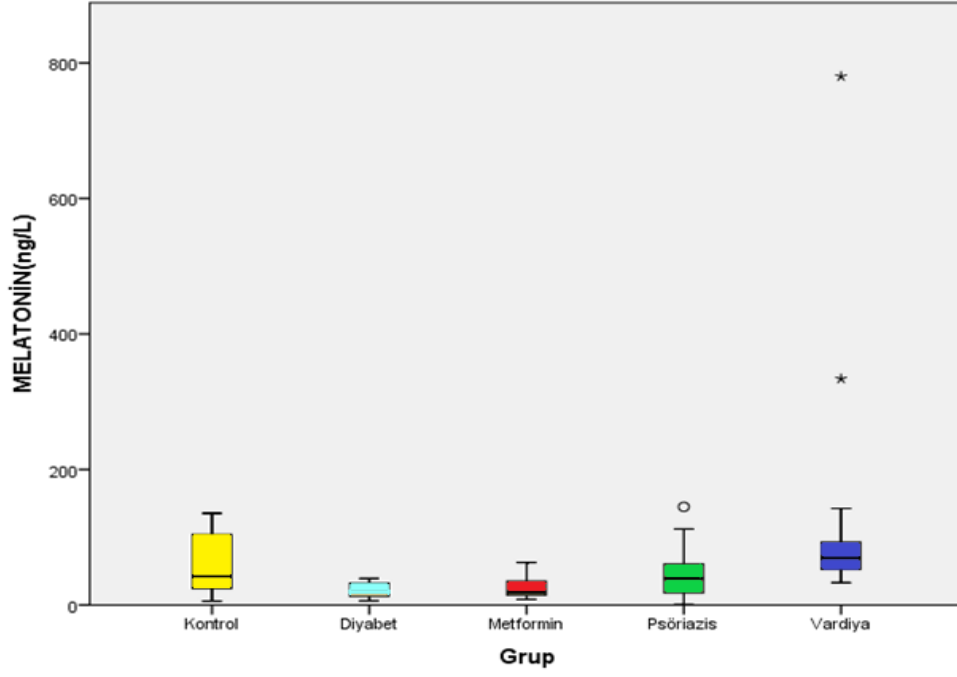
	Gruplar										<i>p</i>
	Kontrol		Diyabet		Metformin		Psöriazis		Vardiya		
	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	
AKŞ(mg/dL)	23	90(82-101) ^{b,c}	19	163(74-350) ^{a,c,d,e}	22	114,5(85-188) ^{a,b,d,e}	17	93(78-194) ^{b,c}	20	95(77-112) ^{b,c}	<0,001
HDL-K(mg/dL)	26	42,35(33-69,9) ^{b,e}	23	37,9(28,4-63,2) ^{a,d}	23	42,2(26,8-79,2)	25	43,6(30,6-66,9) ^{b,e}	25	37,2(24,4-74,1) ^{a,d}	0,025
LDL-K(mg/dL)	26	114,2(74,3-167,2)	20	119,15(49,7-232,7)	23	134,4(59,3-195,1)	23	109,3(54,8-180,7)	24	104,05(64,8-199,1)	0,307
VLDL-K(mg/dL)	26	24,5(9-76,4) ^e	20	33(11,4-127,8) ^d	23	30,8(14,2-62) ^d	23	22,4(5,8-50) ^{b,c,e}	24	36(10,2-109,4) ^{a,d}	0,010
T.KOL(mg/dL)	26	196(130-239)	21	188(142-304)	23	204(118-295)	23	172(104-265)	24	181(149-268)	0,152
TG(mg/dL)	26	123(45-382) ^e	20	165(57-639) ^d	23	154(71-310) ^d	23	112(29-250) ^{b,c,e}	24	180(51-547) ^{a,d}	0,009

* : a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. ** : Değişkenler, 'medyan (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir, $p < 0,05$.

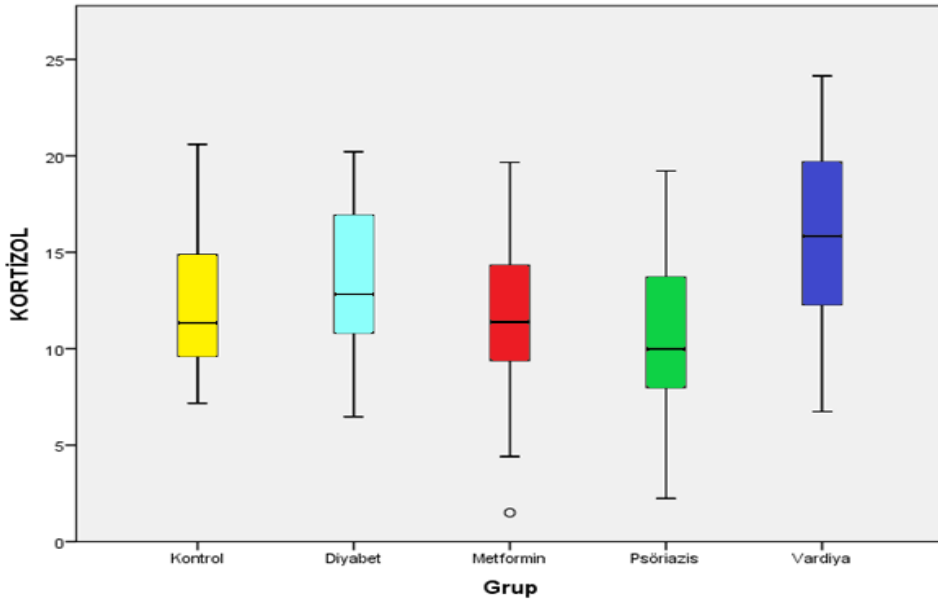
4.3. Sirkadiyen Ritim Belirteçleri Olarak Serum Melatonin ve Kortizol Düzeyleri

Serum melatonin düzeyleri kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında vardiya grubunda anlamlı derecede yüksek; diyabet ve metformin gruplarında ise anlamlı derecede düşük bulundu. Gruplar arası melatonin düzeyleri kıyaslandığında, vardiya grubunun melatonin düzeylerinde; kontrol, diyabet, metformin ve psöriazis grubuna göre önemli bir artış tespit edildi. Diyabet ve metformin grubunun melatonin düzeyleri; kontrol, psöriazis ve vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşüktü. Kontrol ve psöriazis grubunun melatonin düzeyleri ise diyabet ve metformin grubuna göre anlamlı derecede yüksek ve vardiya grubuna anlamlı derecede düşüktü ($p<0,001$) (Tablo 4.3.).

Serum kortizol düzeyleri incelendiğinde, vardiya grubunun kortizol düzeyleri kontrol, metformin ve psöriazis grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Psöriazis grubunun kortizol düzeyleri, diyabet ve vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu. Diyabet grubunun kortizol düzeyleri, psöriazis grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Kontrol ve metformin grubunun kortizol düzeyleri ise vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,003$) (Tablo 4.3.).



Şekil 4.1. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum melatonin düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.2. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum kortizol düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması

Tablo 4.3. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum melatonin ve kortizol düzeyleri

Değişkenler**	Gruplar*										
	Kontrol		Diyabet		Metformin		Psöriazis		Vardiya		p
	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	
Melatonin (ng/L)	20	42,5 (5,86-135,26) ^{b,c,e}	22	19,64 (6,15-39,07) ^{a,d,e}	21	18,78 (8,26-62,75) ^{a,d,e}	24	39,17 (0,38-144,92) ^{b,c,e}	19	69,36 (33,03-780,01) ^{a,b,c,d}	<0,001
Kortizol (µg/dL)	26	11,33 (7,17-20,59) ^e	23	12,83(6,47-20,21) ^d	23	11,39(1,5-19,66) ^e	25	9,99(2,24-19,22) ^{b,e}	25	15,84(6,74-24,14) ^{a,c,d}	0,003

* : a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. ** : Değişkenler, 'medyan (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir, $p < 0,05$.

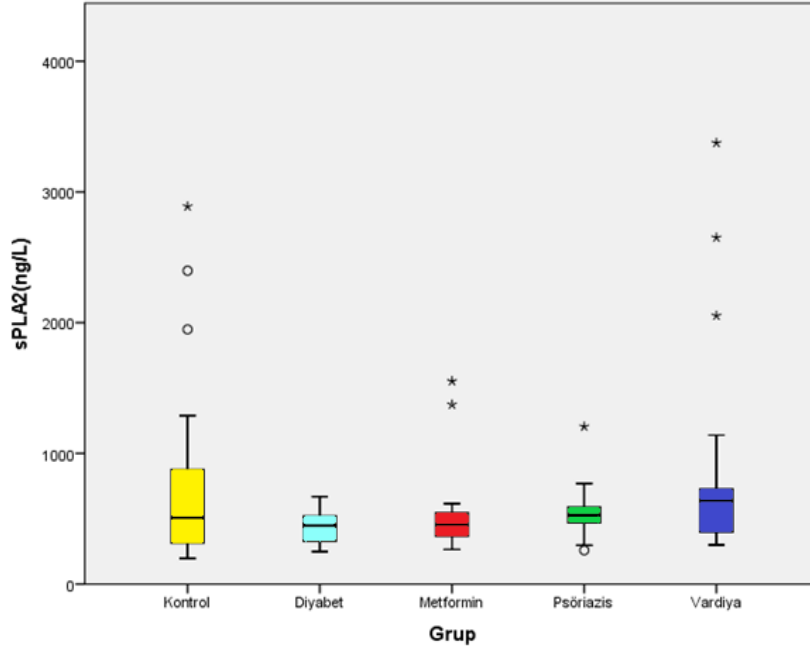
4.4. Fosfolipid Trafikinde Rol Alan sPLA₂, LCAT, EL, PLTP Protein Düzeyleri

Serum sPLA₂ düzeyleri değerlendirildiğinde grupların sPLA₂ düzeylerinde, kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p=0,066).

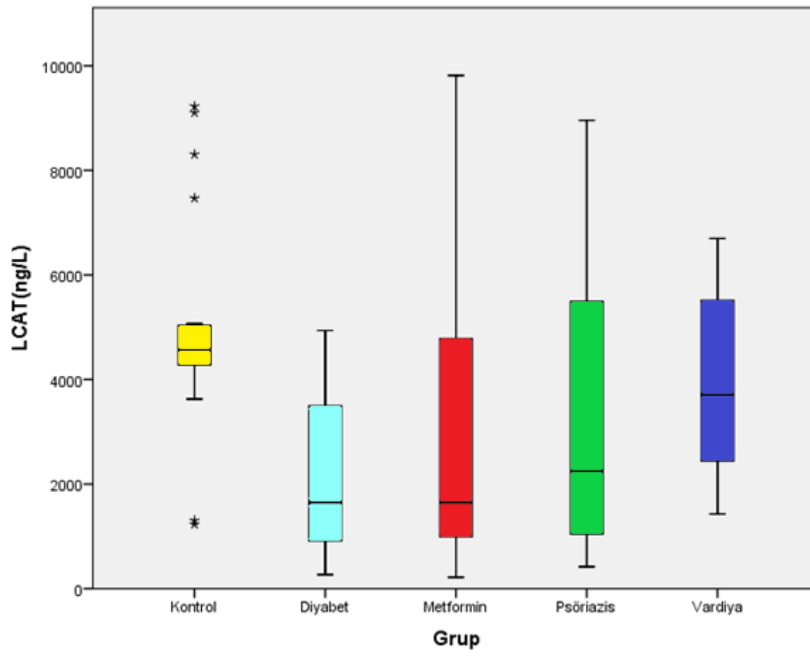
Serum LCAT düzeyleri diyabet, metformin ve psöriazis gruplarında kontrole göre düşüş gözlemlendi. Vardiya grubunda LCAT düzeylerinde, kontrole göre anlamlı fark gözlenmezken diyabet ve metformin gruplarına kıyasla anlamlı olarak düşüş bulundu (p=0,001).

Serum EL düzeyleri incelendiğinde kontrole göre diyabet ve metformin gruplarında anlamlı düşüş tespit edilirken, psöriazis ve vardiya grubunda kontrole göre anlamlı farklılık bulunamadı. Bunun yanı sıra vardiya grubu EL düzeyleri, diyabet grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeylere sahipti (p=0,018).

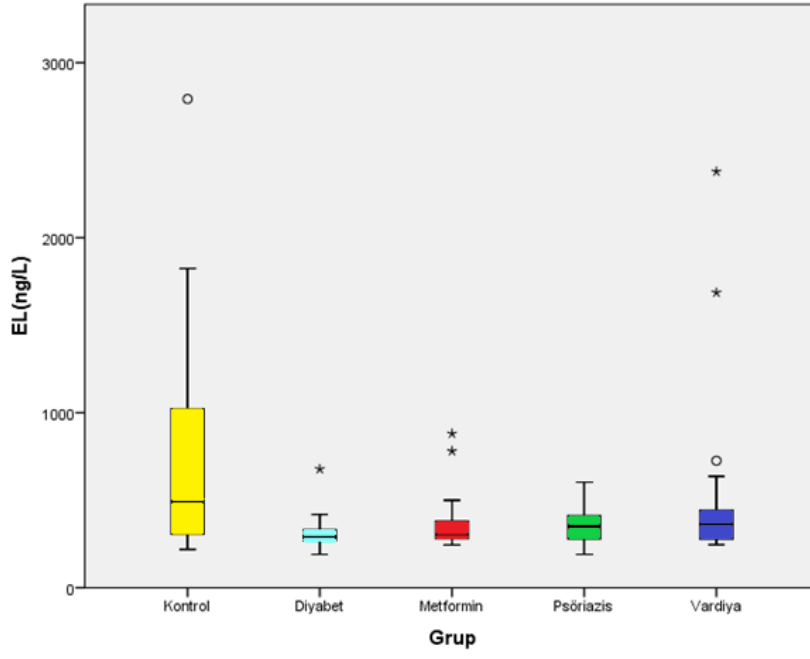
Serum PLTP düzeyleri değerlendirildiğinde diyabet, metformin, psöriazis ve vardiya gruplarında kontrole göre anlamlı olarak düşüş tespit edilmişti (p=0,006) (Tablo 4.4.).



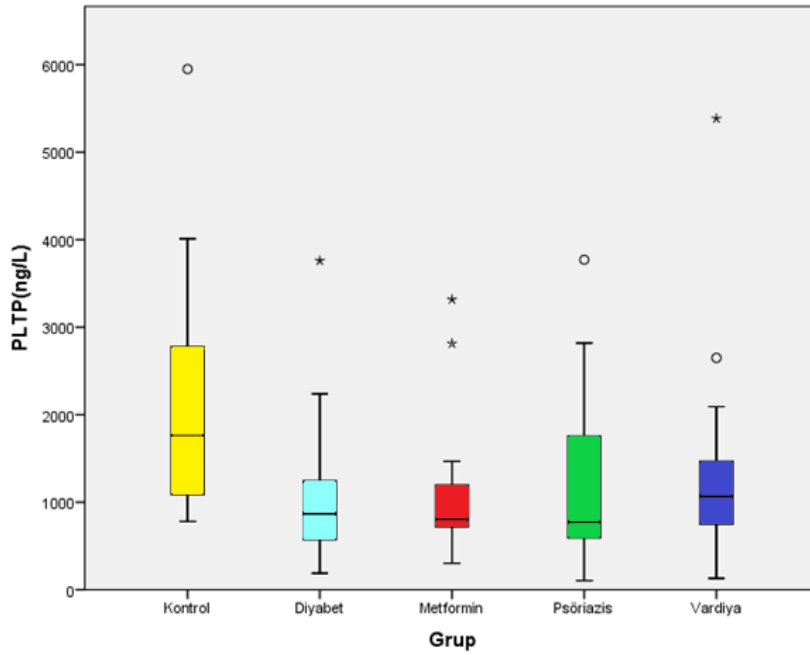
Şekil 4.3. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum sPLA₂ düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.4. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum LCAT düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.5. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum EL düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.6. Sirkadiyen ritim değişimlerinin serum PLTP düzeylerine etkilerinin karşılaştırılması

Tablo 4.4. Kontrol ve hasta gruplarına ait serum sPLA₂, LCAT, EL ve PLTP düzeyleri

Değişkenler **	Gruplar*										
	Kontrol		Diyabet		Metformin		Psöriazis		Vardiya		p
	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	n	Medyan (min.-maks.)	
sPLA₂ (ng/L)	22	507,45 (196,19-2889,13)	23	447,63 (248,32-668,85)	23	453,83 (265,39-1552,26)	25	527,72 (258,51-1205,17)	23	637,53 (300,38-3375,15)	
LCAT (ng/L)	20	4567,08 (1230,2-9226,07) ^{b,c,d}	22	1647,43 (269,33-4937,23) ^{a,d,e}	23	1646,50 (217,15-9816,28) ^{a,e}	25	2248,82 (419,87-8955,8) ^{a,b}	21	3709,40 (1425,8-6698,2) ^{b,c}	0,001
EL (ng/L)	24	491,38 (218,79-2792,26) ^{b,c}	23	289,57 (190,13-678,13) ^{a,e}	23	301,82 (245,25-880,2) ^a	25	350,72 (190,13-602,51)	22	363,39 (245,46-2377,41) ^b	0,018
PLTP (ng/L)	17	1763,32 (779,6-5949,1) ^{b,c,d,e}	20	865,49 (188,92-3760,07) ^a	19	804,10 (303,27-3316,77) ^a	24	771,84 (104,38-3770,48) ^a	20	1066,13 (131,48-5384,18) ^a	0,006

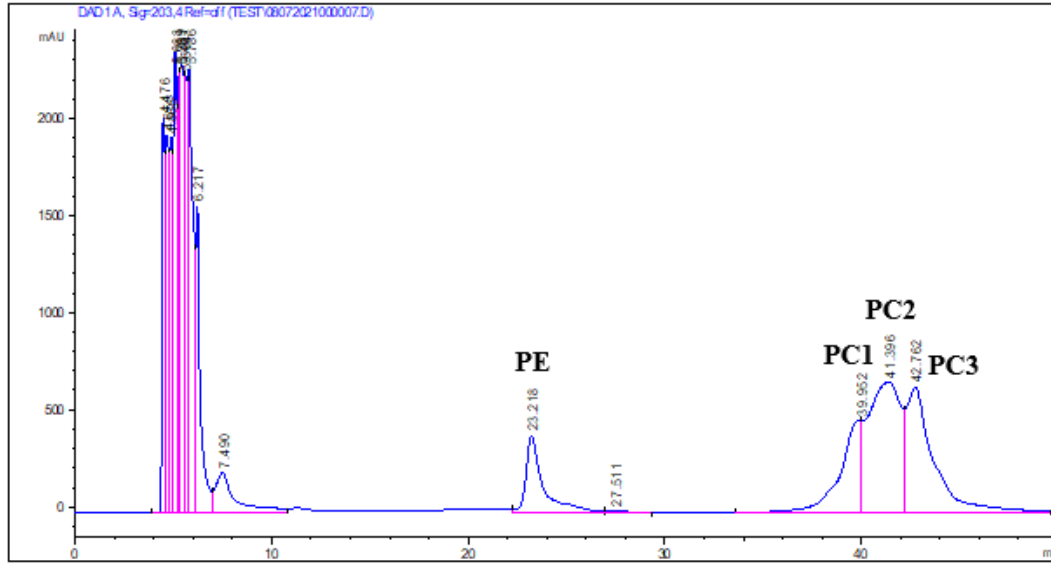
* : a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. ** : Değişkenler, 'medyan (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir, $p < 0,05$.

4.5. Kontrol ve Hasta Gruplarının Serum, HDL ve Eritrosit Fosfolipid Kompozisyonları

4.5.1. Serum Fosfolipid Kompozisyonu

Kontrol ve hasta gruplarına ait serum numunelerinin ve fosfolipid standartlarının HPLC analizlerine göre serumlarda PE ve farklı yağ asidi içeriğine bağlı olduğu düşünülen 3 farklı PC (PC1, PC2 ve PC3) tespit edildi. Kromatogramdaki PC fraksiyonunun 3 farklı pik halinde görülüyor olması (PC1, PC2, PC3) hem sn-1 hem sn-2 pozisyonlarında farklı türde çoklu doymamış ve dallı zincirli yağ asitleri kompozisyonuna sahip PC'lerin farklı retansiyon zamanlarına sahip olması ile açıklanabilir (306). Aynı durum PC standardı için de geçerlidir. Serum ve HDL numunelerinde HPLC yöntemi ile yapılan fosfolipid analizlerinde tespit edilebilen fosfolipidler nispeten yüksek konsantrasyonlarda bulunan PE ve PC'dir. Daha az konsantrasyonlarda bulunan diğer fosfolipid türleri kromatogramda tespit edilemedi. Bu büyük ölçüde HPLC UV dedektörünün fosfolipidlerin UV absorbanlarının düşük olması sebebiyle düşük konsantrasyonlardaki fosfolipidleri tespit edememiş olmasından kaynaklanmış olabilir.

Grupların serum PE yüzde değerleri incelendiğinde diyabet ve kontrol grubunun serum PE yüzde değerlerinin diğer gruplara kıyasla artmış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0,1102$). Serum PC1 yüzde değerleri incelendiğinde PC1 yüzde değerleri açısından gruplarda kontrole göre bir artış vardı fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,676$). Serum PC2 yüzde değerleri incelendiğinde gruplarda kontrole göre bir yükseliş olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi ($p=0,1101$). Serum PC3 yüzde değerleri değerlendirildiğinde vardiya grubunda kontrole göre artış olduğu, diyabet, metformin ve psöriazis grubunda ise bir düşüş olduğu fakat gruplar arasındaki bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu ($p=0,5343$) (Tablo 4.5.).



Şekil 4.7. Serum lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı

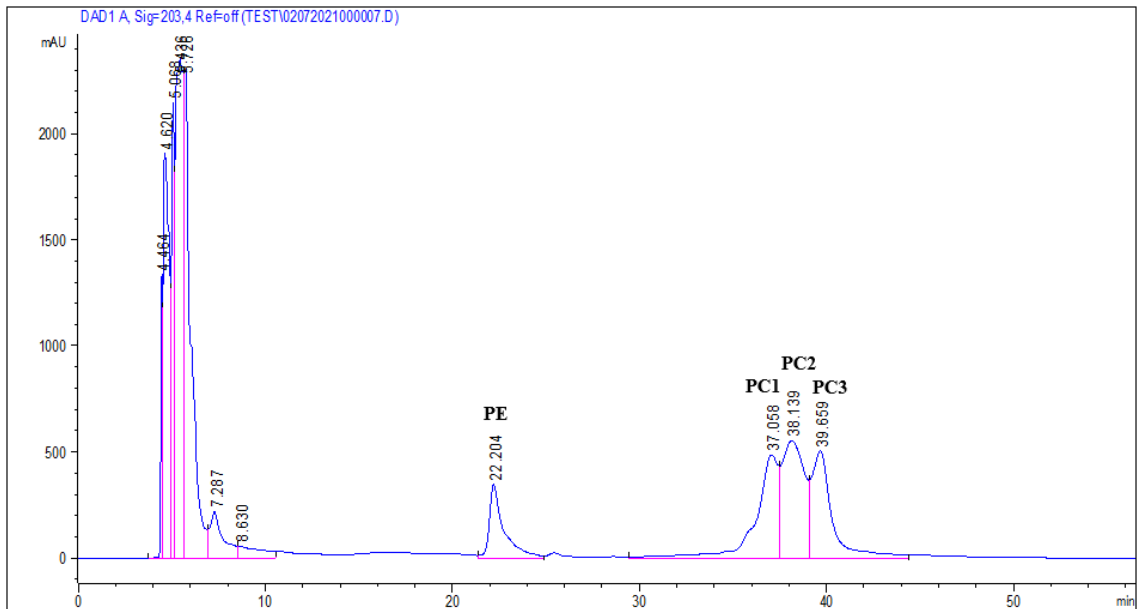
Tablo 4.5. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait serum fosfolipid % değerleri

Değişken**	Gruplar*					<i>p</i>
	Kontrol (n=6)	Diyabet (n=6)	Metformin (n=6)	Psöriazis (n=6)	Vardiya (n=6)	
(Serum)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	
PE	8,28 (5,00-12,29)	9,72 (3,29-11,72)	4,08 (3,21-6,07)	7,47 (1,80-11,99)	4,38 (3,39-8,99)	0,1102
PC1	18,70 (17,57-31,47)	21,73 (17,92-28,07)	23,81 (19,18-26,26)	20,73 (14,76-26,12)	22,90 (16,67-28,84)	0,676
PC2	38,43 (37,52-47,61)	41,12 (37,95-43,78)	43,24 (39,03-46,91)	44,23 (42,12-47,09)	40,54 (36,72-43,55)	0,1101
PC3	30,26 (24,22-33,08)	26,95 (22,61-35,38)	29,82 (25,39-32,81)	27,77 (23,08-35,16)	32,52 (21,36-35,15)	0,5343

*: a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. **: Değişkenler, 'ortanca (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir. PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, $p < 0,05$.

4.5.2. HDL Fosfolipid Kompozisyonu

HPLC ile fosfolipid analizleri değerlendirildiğinde gruplara ait HDL numunesi ve standartlar kıyaslandığında örneklerin içerdiği fosfolipidler, PE ve farklı yağ asidi içeriğine bağlı olduğu tahmin edilen PC olduğunu düşündüğümüz 3 farklı PC olabilir ve bu fosfolipidler; PC1, PC2 ve PC3 şeklinde kodlanmıştır. Kontrol ve hasta gruplarına ait HDL numunelerinin içeriğindeki PE, PC1, PC2 ve PC3 yüzde değerleri incelenmiştir. HDL PE yüzde değerleri değerlendirildiğinde diyabet, metformin, psöriazis ve vardiya grubunda kontrole göre azalma vardı fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,5482$). HDL PC1 yüzde değerleri açısından kontrol grubuna göre gruplarda bir artış vardı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p=0,5852$). HDL lipoproteininde PC2 yüzde değerleri açısından metformin grubunun kontrole ve diğer gruplara göre artmış olduğu fakat istatistiksel anlamda gruplar arası önemli bir farklılık olmadığı gözlemlendi ($p=0,6249$). HDL PC3 yüzde değerleri incelendiğinde psöriazis grubunun kontrole ve diğer gruplara göre artmış olduğu ancak gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadığı saptandı ($p=0,1024$) (Tablo 4.6.).



Şekil 4.8. HDL lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı

Tablo 4.6. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait HDL fosfolipid % değerleri

Değişken**	Gruplar*					<i>p</i>
	Kontrol (n=6)	Diyabet (n=6)	Metformin (n=6)	Psöriazis (n=6)	Vardiya (n=6)	
(HDL)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	
PE	19,96 (13,45-22,91)	16,00 (10,64-23,36)	14,98 (7,93-21,80)	15,04 (2,99-29,03)	14,29 (7,04-35,49)	0,5482
PC1	19,71 (15,46-27,80)	23,27 (19,75-30,91)	22,25 (18,78-25,51)	20,23 (15,33-25,80)	22,38 (16,10-31,43)	0,5852
PC2	36,68 (33,68-42,90)	39,64 (34,41-41,87)	42,34 (31,31-42,71)	39,72 (30,36-44,14)	38,90 (30,62-40,86)	0,6249
PC3	22,82 (19,18-26,89)	21,43 (15,46-22,36)	23,86 (17,27-27,35)	26,30 (23,42-34,51)	23,04 (17,77-29,99)	0,1024

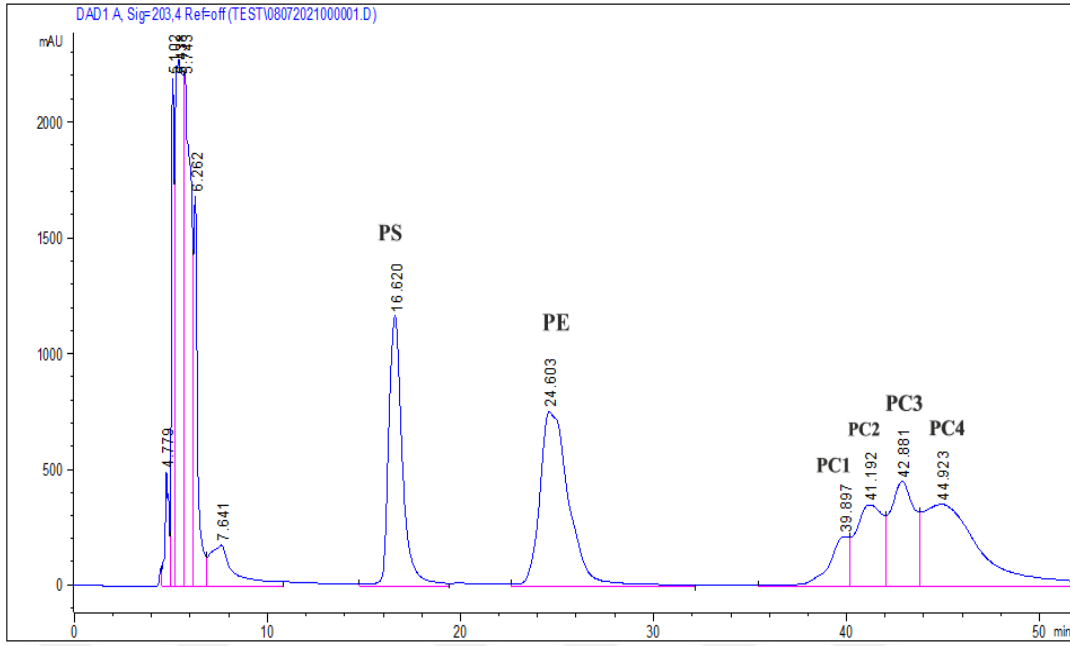
*: a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. **: Değişkenler, 'ortanca (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir. PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, $p < 0,05$.

4.5.3. Eritrosit Membran Fosfolipid Kompozisyonu

HPLC ile fosfolipid analizleri değerlendirildiğinde gruplara ait eritrosit numunesi ve standartlar kıyaslandığında örneklerin içerdiği fosfolipidlerin; PS, PE ve farklı yağ asidi içeriğine bağlı olduğu tahmin edilen 4 farklı PC olduğu kanaatine varılmıştır ve bu fosfolipidler; PC1, PC2, PC3 ve PC4 şeklinde kodlanmıştır. PC4 fraksiyonu serum ve HDL fraksiyonlarında belirgin olarak görülmedi. Eritrosit membranının sıklıkla sitozole bakan yüzeyinde bulunan ve hücre sinyal yollarında önemli bir rol oynayan PS pikinin tüm pik alanları içerisinde yüzde alanı değerlendirildiğinde vardiya grubunun kontrol ve diğer gruplara göre yüksek olduğu fakat bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p=0,837$).

Esas olarak hücre membranının sitozole bakan yüzeyinde bulunan ve membran eğriliğinde önemli bir rol oynadığı düşünülen fosfolipidlerden biri olan PE'nin tüm pik alanları içerisinde yüzde değeri incelendiğinde diyabet, metformin ve psöriazis gruplarının kontrole göre düşük olduğu fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi ($p=0,059$).

Eritrosit membranının esas fosfolipidlerinden olan ve önemli bir araşidonik asit deposu olarak aykozanoit sentezine katılan PC yüzde değerleri içerisinde PC1 yüzde alanı, diyabet ve metformin gruplarında kontrole göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlılık yoktu ($p=0,158$). PC2 yüzde değerleri gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenemedi ($p=0,352$). PC3 yüzde değerleri incelendiğinde gruplarda kontrole göre anlamlı fark yoktu ($p=0,357$). PC4 yüzde değerleri incelendiğinde diyabet grubunda kontrole göre anlamlı bir yükselme vardı; ayrıca psöriazis grubu düzeyleri, vardiya grubuna göre anlamlı derecede yüksekti. Kontrol ve metformin gruplarının PC4 yüzde değerleri psöriazis grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,03$) (Tablo 4.7.).



Şekil 4.9. Eritrosit lipid ekstraktının HPLC fosfolipid analizinin kromatogramı

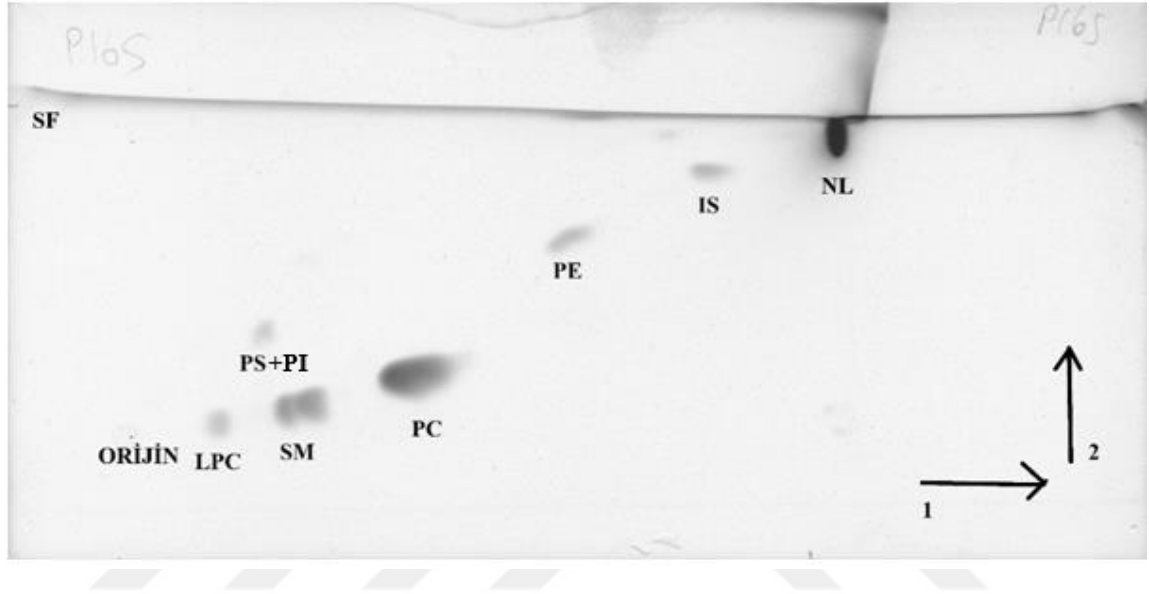
Tablo 4.7. HPLC analizlerine göre kontrol ve hasta gruplarına ait eritrosit membranı fosfolipid % değerleri

Değişken**	Gruplar*					<i>p</i>
	Kontrol (n=6)	Diyabet (n=6)	Metformin (n=6)	Psöriazis (n=6)	Vardiya (n=6)	
(Eritrosit membranı)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	Medyan (min.-maks.)	
PS	17,43 (15,46-21,95)	18,89 (15,10-23,22)	17,96 (17,35-21,27)	18,14 (7,74-19,43)	19,06 (15,67-20,68)	0,837
PE	27,66 (25,57-30,17)	25,63 (21,28-28,42)	24,60 (23,69-25,40)	25,80 (24,31-30,69)	27,52 (24,33-30,37)	0,059
PC1	5,18 (4,71-8,74)	5,93 (4,49-7,79)	6,76 (5,29-9,40)	4,94 (3,81-7,04)	5,24 (4,85-7,30)	0,158
PC2	13,45 (11,74-17,65)	12,90 (11,88-15,28)	13,78 (12,33-15,93)	12,96 (11,24-14,04)	12,76 (11,97-14,42)	0,352
PC3	16,19 (14,04-17,44)	14,09 (11,62-17,64)	16,60 (13,76-16,90)	16,22 (13,52-18,60)	15,35 (13,92-16,45)	0,357
PC4	16,47 ^d (15,28-20,79)	21,13 ^a (17,97-27,87)	19,95 ^d (17,60-21,96)	23,09 ^e (20,20-24,95)	19,44 (17,40-24,66)	0,03

*: a: Kontrol grubuna göre farklıdır, b: Diyabet grubuna göre farklıdır, c: Metformin grubuna göre farklıdır, d: Psöriyazis grubuna göre farklıdır, e: Vardiya grubuna göre farklıdır. **: Değişkenler, 'ortanca (min.-maks.)' şeklinde özetlenmiştir. PS: Fosfatidilserin, PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, $p < 0,05$.

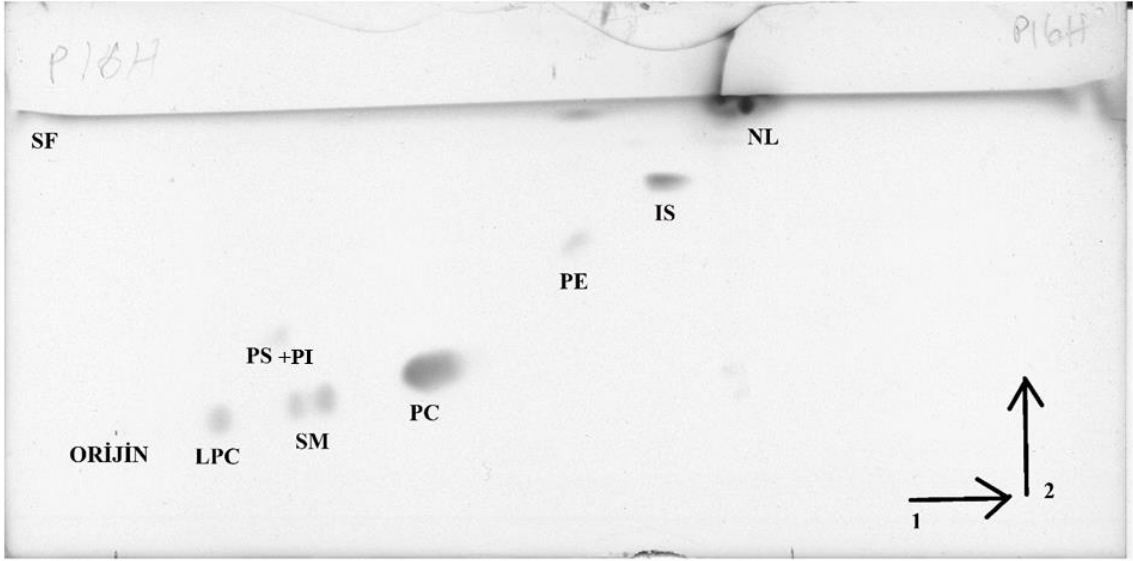
4.6. Kontrol ve Hasta Gruplarının Serum, HDL ve Eritrosit Fosfolipid Kompozisyonlarının HPTLC ile Analizi

Gruplardaki numunelerin tamamı çalışılmadığından, kontrol ve hasta gruplarının HPTLC analizlerinden elde edilen fosfolipid yüzde değerleri istatistiksel değerlendirmeye alınamamıştır (Tablo 4.8, 4.9, 4.10).



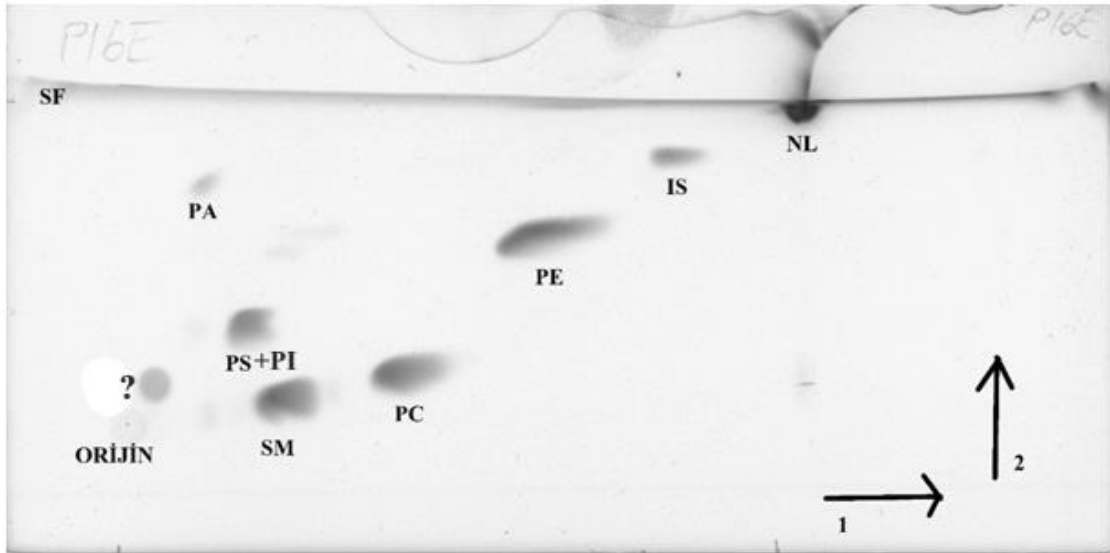
Şekil 4.10. Serum lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı

LPC: Lizofosfaditilkolin, PS: fosfaditilserin, PI: Fosfaditilinozitol, SM: Sfingomyelin, PC: Fosfaditilkolin, PE: Fosfaditiletanolamin, IS: İnternal standart, NL: Nötral lipid, SF: solvent front, 1: Birinci yürütme yönü, 2: İkinci yürütme yönü.



Şekil 4.11. HDL lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı

LPC:Lizofosfaditilkolin, PS:Fosfaditilserin, PI:Fosfaditilinozitol, SM: Sfingomyelin, PC: Fosfaditilkolin, PE: Fosfaditletanolamin, IS: İnternal standart, NL: Nötral lipid, SF: Solvent front, 1: Birinci yürütme yönü, 2: İkinci yürütme yönü.



Şekil 4.12. Eritrosit lipid ekstraktına ait HPTLC kromatogramı

LPC: PI:Fosfaditilinozitol, PS: Fosfaditilserin, SM: Sfingomyelin, PC: Fosfaditilkolin, PE:Fosfaditletanolamin, IS: İnternal standart, NL: Nötral lipid, SF: Solvent front, 1: Birinci yürütme yönü, 2: İkinci yürütme yönü, ?: Bilinmeyen.

Tablo 4.8. Kontrol ve hasta gruplarının eritrosit numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri

Gruplar	Eritrosit Membranı				
	PE	PC	SM	?	PS+PI
	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD
Kontrol (n=9)	26,15±3,10	23,18±1,87	25,27±2,56	7,94±0,82	17,46±1,54
Diyabet (n=10)	27,39±3,99	24,46±1,85	24,72±2,86	8,51±1,16	14,92±5,47
Metformin (n=10)	25,44±4,69	24,14±2,01	25,48±4,56	7,74±1,52	17,20±2,40
Psöriazis (n=9)	27,41±3,58	23,51±1,70	23,54±3,54	8,37±1,58	17,17±3,49
Vardiya (n=10)	25,42±2,56	23,20±1,90	25,36±2,45	8,27±1,65	17,75±3,56

PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, SM: Sfingomyelin, PS: Fosfatidilserin, PI: Fosfatidilinozitol, LizoPC: Lizofosfatidilkolin, ?: Bilinmeyen, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma

Tablo 4.9. Kontrol ve hasta gruplarının HDL numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri

Gruplar	HDL				
	PE	PC	SM	PS+PI	LizoPC
	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD
Kontrol (n=9)	14,13±2,85	39,71 ±3,41	22,87±2,36	9,64±0,98	13,65±1,69
Diyabet (n=10)	13,76±2,84	39,97±3,25	24,79±1,91	8,76±2,02	12,73±1,44
Metformin (n=10)	13,60±1,97	39,33±2,41	24,27±1,41	8,84±1,53	13,96±2,48
Psöriazis (n=9)	11,92±1,53	42,53±3,69	24,64±2,01	8,59±2,11	12,32±1,71
Vardiya (n=10)	12,25±1,88	41,67±3,98	24,38±0,80	9,45±1,64	12,25±2,21

PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, SM: Sfingomyelin, PS: Fosfatidilserin, PI: Fosfatidilinozitol, LizoPC: Lizofosfatidilkolin, ?: Bilinmeyen, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma

Tablo 4.10. Kontrol ve hasta gruplarının serum numunesi HPTLC sonuçlarına göre fosfolipid % değerleri

Gruplar	Serum				
	PE	PC	SM	PS+PI	LizoPC
	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD	Ort± SD
Kontrol (n=9)	13,52±2,75	39,89±3,49	28,52±2,24	7,61±3,00	10,46±1,62
Diyabet (n=10)	13,19±2,74	41,10±2,62	27,31±2,59	8,17±1,51	10,23±1,33
Metformin (n=10)	12,52±1,84	41,73±3,57	25,82±1,79	9,15±1,17	10,78±1,85
Psöriazis (n=9)	12,37±2,18	40,42±2,92	26,50±1,09	9,34±2,35	11,37±1,57
Vardiya (n=10)	12,54±1,56	42,87±2,33	26,48±2,99	7,79±1,96	10,32±2,22

PE: Fosfatidiletanolamin, PC: Fosfatidilkolin, SM: Sfingomyelin, PS: Fosfatidilserin,
PI: Fosfatidilinozitol, LizoPC: Lizofosfatidilkolin, ?:Bilinmeyen, Ort: Ortalama, SD: Standart Sapma

5.TARTIŞMA

Modern yaşam tarzının getirdiği elektrik ve buna bağlı olarak ışığa, enerjiye ve yiyeceğe sürekli erişimin yanı sıra 7/24 çalışma programları, geç yenen akşam yemekleri, yağdan zengin yiyeceklerin tüketimi ve zaman dilimleri arasında seyahatlerin sıklaşması, insanların doğal aydınlık-karanlık, uyku-uyanıklık döngüsünden uzaklaşmalarına ve insan sirkadiyen sistem fizyolojisinde değişimlere sebep olmaktadır (7). Bu değişimler insanlarda çevresel ritimler ve endojen sirkadiyen ritimler arasında desenkronizasyonlara ve aynı zamanda sirkadiyen sistemin merkezi ve periferik saatleri arasında senkronizasyon bozukluğuna yol açmaktadır (6). Bu sirkadiyen sistem bozukluklarının günümüzde yaygın olarak görülen metabolik sendrom (10,11), obezite, T2DM (8), ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar (13), zihinsel bozukluklar (9), kanser ve nöropsikiyatrik bozukluklar (12) gibi birçok kronik hastalığın patogeneziye katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

İnsan vücudunda karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarına ait farklı metabolik yolların aktivitesi gün içerisinde farklı zamanlarda artmakta ve azalmakta, gün içerisinde ritmik dalgalanmalar, osilasyonlar göstermektedir. Bu durum farklı metabolik yolların, organizmanın metabolizmasını en etkin, en faydalı hale getirme gereğinin bir sonucu olarak senkronizasyonunu sağlamaktadır. Metabolik yolların aktivitelerindeki ritmik değişimler, sirkadiyen CLOCK genlerin ve müteakiben CLOCK genlerin kontrolü altında olan genlerin koordineli ekspresyonları sonucunda meydana gelir. Mevcut çalışmalar, uygun olmayan zamanlarda besin tüketiminin, bazı ilaçların kullanımlarının, uyku kısıtlamalarının ve bazı hastalıkların sirkadiyen ritmin bozulmasına yol açarak metabolik disfonksiyonlara ve neticede diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıklara yol açtığını ortaya koymaktadır (5).

Lipid yolları, tüm ana metabolik dokularda sirkadiyen kontrol altındadır ve saat işlevinin kaybı, anormal yağ depolaması ve lipid taşınması, dolaşımdaki glukoz ve trigliserid düzeylerinin değişmesi ve diyet lipidlerinin emilimindeki eksiklikler ile sonuçlanır. İnsan plazmasının lipidomik analizi, tüm lipid profillerinin yaklaşık %18'inin uyku ve gıda alımından bağımsız olarak sirkadiyen bir şekilde salındığını göstermiştir (75). Çalışmalarda osilasyon gösterdiği tespit edilen 587 lipid molekülü içerisinde, gliserolipidler (%62), gliserofosfolipidler (%32) ve daha az ölçüde sfingolipidler, sterol lipidler ve yağ asitleri vardır. Lipid sınıfları içerisinde, günlük

salınımların en sık TG (%57), ardından PI (%5,8), PC (%5,5) ve PE (%3,9) olduğu belirtilmektedir (83). Diğer bir insan plazma metabolomik incelemesinde sirkadiyen varyasyon gösteren metabolitlerin çoğunluğunu açilkarnitinler, PC ve lizofosfolipidlerin oluşturduğu tespit edilmiştir (15). Bu fosfolipidler plazma membranının dış katmanının önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu nedenle, sirkadiyen saatin plazma membranının fonksiyonunu etkileyebileceğini ve hücre reseptör sinyal yolları üzerinde önemli etkileri olabileceği düşünülmektedir (18). Aynı zamanda bu fosfolipid metabolitlerinin üretiminden ve değişik lipoproteinler arasındaki transferinden sorumlu proteinler olan; PLTP, LCAT, sPLA₂ ve EL'nin de sirkadiyen osilasyonlar gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (17). Sekresyonlarının belirgin bir sirkadiyen ritme tabi olması nedeniyle melatonin ve kortizol düzeyleri günümüzde kullanılan en iyi periferik insan sirkadiyen faz belirteçleridir (26).

Bu amaç doğrultusunda sirkadiyen ritim bozukluklarına neden olduğu bilinen dört durum seçilmiştir. Bunlardan birincisi, özellikle prediyabetli/diyabetli hastaların tedavisinde metformin kullanımınıdır. İkincisi sirkadiyen ritim bozukluğu bildirilen bir hastalık, psöriazistir. Üçüncü durum yeni tanı konmuş, komplikasyon gelişmemiş T2DM'dir. Dördüncü durum ise gece vardiyasında çalışmaktır.

Metforminin hem merkezi hem de periferik saat genlerinin ekspresyonlarını değiştirerek sirkadiyen faz kaymalarına sebep olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (28). Psöriazis hastalığı da patofizyoloji belirsiz olsa da, sirkadiyen ritim anormallikleriyle ilişkilendirilmiştir (233). Kemirgenlerdeki psöriazis modellerinde yapılan genetik çalışmalar, psöriazis patogenezinin sirkadiyen saat tutulumunun katkıları olduğunu göstermektedir (230). T2DM patogenezinde genetik faktörlerin rolü netleşse de, çevresel ve epigenetik faktörlerin, T2DM prevalansındaki son artışa birincil katkıda bulunanlar olduğu görülmektedir (307). Bu bağlamda, daha yeni kanıtlar, normal sirkadiyen ritimlerin bozulmasıyla ilişkili çevresel koşulların, artan T2DM insidansı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (308). Vardiyalı çalışmada ise denekler günlük rutine uymayan zamanlarda beslenme, uyku, aktivite, yapay ışığa maruz kalma gibi faktörlerle sirkadiyen sistem bozucularına maruz kalmakta hem merkezi hem de periferik saatleri etkilenmektedir. Bu dört gruptaki insanların (Diyabet, metformin, psöriazis ve vardiya grubu) kan numunelerinde serum, HDL ve eritrosit membranındaki fosfolipid kompozisyonlarındaki değişimlerin ve fosfolipid metabolizmasıyla ilgili serum PLTP, LCAT, sPLA₂ ve EL proteinlerinin düzeyleri ve sirkadiyen faz

biyobelirteçleri olarak melatonin ve kortizol hormonunun düzeyleri tespit edilip kontrole göre karşılaştırılarak, sirkadiyen ritim bozukluklarının teşhisi ve tedavisine yönelik olarak kullanılabilecek yeni yaklaşımların ve hedeflerin ortaya konulması ihtimali değerlendirilmiştir. Serum-HDL lipoproteinler ve eritrosit membranı arasında fosfolipid transferi ve değişimlerine yol açan ve düzeyleri tespit edilmesi hedeflenen proteinler aterosklerozis ile bağlantılı olduklarından, sirkadiyen ritim bozuklukları ile KKH arasındaki bağlantının aydınlatılması da bu çalışmanın diğer önemli amacıdır.

Çalışmada serum AKŞ düzeyleri incelendiğinde diyabet ve metformin grubunda kontrol, vardiya ve psöriazis grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. T2DM’de, pankreas adacık yetmezliği sonucu hiperglisemi gelişir. Ayrıca T2DM’de esas olarak iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusu düzeyinde insülin direnci kendini gösterir ve bozulmuş insülin ile uyarılan glukoz atılımı, hepatik glukoz üretiminin baskılanamaması sonucu plazma açlık glukozu normal seviyelerine düşürülemez (308). Diyabet grubu, zaten yeni tanı konmuş T2DM’li hastalardan oluştuğu için yüksek serum AKŞ düzeylerinin saptanması buna atfedilebilir. Metformin grubuna ise çoğunlukla prediyabetik evrede olan katılımcılar dahil edilmiştir. Prediyabet, diyabetes mellitus gelişiminin ön safhası olan, diyabet tanısı koymak için yeterli semptomun olmadığı fakat diyabet eşiğine gelmemiş yüksek serum glukozunun gözlendiği (bozulmuş açlık glukozu veya bozulmuş glukoz toleransı) bir sendromdur. Bu metformin grubunda yüksek serum AKŞ düzeylerinin saptanmasının nedeni olabilir.

HDL-K düzeylerinin diyabet ve vardiya grubunda kontrol ve psöriazis grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Düşük HDL-K seviyeleri, birden çok faktöre bağlı ortaya çıkmış olabilir. Bunlar, hipertrigliseridemi, diyabet ve obezite, kronik ve inflamatuvar hastalıklar, sigara içimi, karaciğer-bağırsak hastalıkları, ilaç-hormonlar, genetik faktörler ve sedanter yaşam tarzıdır (309). T2DM ve insülin direnci ile ilişkili HDL-K’deki azalmalar multifaktöriyeldir, ancak esas faktör, aslında kolesterolün HDL’den trigliseritten zengin lipoproteinlere transferinin artması ve trigliseridin HDL’ye karşılıklı transferi gibi görünmektedir. Trigliseritten zengin HDL partikülleri hepatik lipaz tarafından hidrolize edilir ve bunun sonucunda hızla katabolize olur ve plazmadan temizlenir. Tipik olarak, T2DM’li hastaların plazmasındaki azalmış HDL seviyeleri, HDL_{2b} alt türlerinde azalmalar ve daha küçük, daha yoğun HDL_{3b} ve HDL_{3c}’de nispi veya mutlak artışlar olarak kendini gösterir (310). Ayrıca T2DM grubunun obezite oranlarının yüksek olması, erkek hastaların daha çok olması ve

inflamasyon varlığı da HDL-K düşüklüğüne neden olmuş olabilir (309). Vardiya grubunun azalmış HDL-K seviyeleri, vardiyalı çalışmanın biyolojik ritimleri bozarak insülin direnci ve T2DM yatkınlığı oluşturması, yüksek sigara içme oranları, gece yüksek yağlı diyet alışkanlıkları, fiziksel aktivite zamanının farklı olması, erkek katılımcı sayısının daha fazla olması, aşırı kilo ve yüksek VKİ oranlarının olmasına atfedilebilir. Vardiyalı çalışma ve özellikle gece vardiyasında çalışmanın dislipidemik etkilerinin incelendiği bir araştırmada, katılımcıların aşırı kilolu olma riski %44 ve gündüz çalışanlara göre 0,56 kg/m² daha yüksek VKİ'ye sahip oldukları ve HDL-K düzeylerinin düşük olduğu bildirilmiştir (311). Psöriazis; lipid profilinde, lipid peroksidasyonunda, antioksidan kapasitede, eikozanoid metabolizmasında ve kardiyovasküler olayların artmış sıklığında anormallikler ile ilişkili inflamatuvar bir hastalıktır (312). Psöriaziste lipidleri araştıran çok sayıda çalışmanın büyük bir meta-analizi, psöriatik hastaların HDL-K konsantrasyonu önemli ölçüde düşüş saptamıştır (313). Oysa ki psöriazis grubunun HDL-K düzeyleri kontrole göre yüksek (anlamsız) tespit edilmiş ve bu durum grup katılımcılarının nispeten daha genç olması, VKİ değerlerinin düşük olması, hastalık süresinin uzun olmaması, diyet ve egzersiz alışkanlıklarına bağlı olabileceği düşünülebilir.

Çalışmada grupların serum TG düzeyleri incelendiğinde kontrole göre vardiya grubunun daha yüksek TG konsantrasyonlarına sahip olduğu; psöriazis grubunun ise kontrole göre anlamlı olmayan düşük düzeylere sahip olduğu gözlenmiştir. Çalışmalar, değişen yaşam tarzları, sirkadiyen ritimlerin uyumsuzluğu ve kronik iş stresi nedeniyle bozulan metabolik regülasyonun vardiyalı çalışma ile artan kardiyovasküler risk arasındaki ilişkiyi kısmen açıklayabildiğini göstermektedir. Son zamanlarda, vardiyalı çalışanlar arasında metabolik sendromun ve ayrı bileşenlerinin (abdominal obezite, hipertansiyon, yüksek TG ve glukoz seviyeleri, düşük HDL-K) daha yüksek prevalansları gösterilmiştir (61). T2DM ve prediyabet; düşük HDL-K, küçük yoğun LDL partiküllerinin baskınlığı ve yüksek TG düzeyleri dahil olmak üzere birbiriyle ilişkili plazma lipid ve lipoprotein anormallikleri kümesi ile ilişkilidir. Bu değişiklikler aynı zamanda birçok T2DM vakasının altında yatan insülin direnci sendromunun (metabolik sendrom olarak da bilinir) bir özelliğidir ve aterojenik dislipidemide önemli bir rol oynamaktadır. Değişiklikler, hem artan VLDL hepatik sekresyonunu hem de VLDL'nin bozulmuş klirensini ve bağırsaktan türetilen şilomikronları içerir. Gecikmiş klirens, hem VLDL'nin hem de tokluk şilomikronlarının kısmen lipolizli kalıntı

partiküller olarak uzun süreli plazma tutulmasıyla sonuçlanır. Bu sonuçlar metformin ve diyabet grubunda anlamsız da olsa TG yüksekliğini açıklayabilir (310). Vardiya grubunda da kontrole göre anlamlı trigliserid yüksekliği göze çarpmaktadır. Bu durum bu grubun kilo oranlarının yüksekliği, geceleri fazla kalori alımı, bilinmeyen T2DM veya insülin direnci varlığı, doymuş yağ tüketimi veya alkol tüketimine bağlı ortaya çıkmış olabilir. Psöriazis grubunda ise düşük TG düzeylerinin gözlenmesi ise psöriazis grubunun çoğunlukla genç, düşük kilolu olması, diyet alışkanlıklarının farklı olması ve T2DM, hipotiroidi gibi ek hastalıkları olmayan hastalardan oluşmasına bağlanabilir.

Kardiyometabolik risk faktörleri arasında yüksek LDL-K konsantrasyonları, aterosklerozun gelişimi ve ilerlemesi ve kardiyovasküler hastalık olaylarıyla kapsamlı bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Grupların LDL-K düzeyleri değerlendirildiğinde tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Yapılan araştırmalara göre LDL-K düzeyleri diyabeti olan bireylerle, diyabeti olmayanlar arasında belirgin bir farklılık bulunmamıştır. Aslında ateroskleroz riskini arttıran T2DM'de meydana gelen LDL değişikliği, küçük yoğun LDL partikül fraksiyonunun artışıdır. Çünkü LDL partiküllerinin heterojen partiküller olduğu ortaya çıkmıştır ve küçük yoğun LDL partiküllerinin; arter duvarına daha iyi nüfuz etmeleri, LDL reseptörüne daha düşük bağlanma afinitesi, daha uzun plazma yarılanma ömrü ve oksidatif strese karşı daha zayıf dirençleri nedeniyle büyük yüzer LDL partiküllerinden daha aterojenik oldukları düşünülmektedir (314). Aslında bu lipid değişikliğinin ana nedeni, diyabette adipositlerde oluşan insülin direncinin serbest yağ asitlerinde artışa yol açmasıdır. Artan serbest yağ asitlerinin karaciğere girişiyle yeterli düzeyde glikojen depoları varlığında trigliserid üretimi uyarılır. İnsülinin serbest yağ asidi salınımını inhibe etme fonksiyonundaki bozulmayla da hepatik VLDL sekresyonu artar (315). VLDL partiküllerinin lipoliz de dahil olmak üzere bir dizi adım yoluyla intravasküler işlenmesiyle küçük yoğun LDL partikülleri açığa çıkmaktadır. CETP'nin etkisiyle lipolitik ürünlerin daha fazla trigliserid zenginleşmesi, hepatik lipaz tarafından trigliserid ve fosfolipitlerin hidrolizi ile birlikte, küçük yoğun LDL partiküllerinin artan üretimine yol açar. Bu LDL partiküllerinin plazmada kalma süresi, LDL reseptörlerine olan afinitelerinin nispeten azalması nedeniyle de uzayabilir (310). Metabolik sendromda, genellikle LDL-K seviyeleri normaldir, ancak LDL partikül boyutu küçüktür ve LDL partiküllerinin sayısı artar (314). Çalışmada metformin grubunun LDL-K düzeylerinin diğer gruplara göre anlamlı olmasa da daha yüksek düzeylerde

olduğu tespit edilmiştir. Yapılan alışmalar da prediyabetik bireylerin (Metformin grubu) diyabet geliştirmeyen bireylere göre genellikle daha yüksek LDL-K düzeyleri olduğunu göstermektedir (310).

Çalışmada serum VLDL-K düzeyleri incelendiğinde vardiya grubunun VLDL-K düzeyleri kontrole göre yüksek sonuçlanmıştır. Bu durum muhtemelen bu grup katılımcılarının çoğunlukla fazla kilolu olması ve insülin direnci gelişmiş olma ihtimaline bağlı ortaya çıkmış olabilir. İnsülin, hepatik VLDL üretimini baskılayarak ve lipoprotein lipazın aktivasyonu ile VLDL'nin uzaklaştırılmasını uyararak serum VLDL konsantrasyonlarını kritik bir şekilde düzenlemektedir (316). İnsülin direnci varlığında ise karaciğere yağ asidi akışında artma olur ve TG sentezi de artar. Yeni sentezlenen TG, ApoB degradasyonunu inhibe eder ve böylece hepatik VLDL rimi artmış olur. İnsülin direncinin VLDL katabolizmasını azaltıcı etkileri olduğu da öne sürülmektedir. Lipoprotein lipazı inhibe etmesi ve ApoC3 üretimini uyarması, VLDL katabolizmasını azaltarak artan VLDL partikül konsantrasyonuna katkıda bulunabilir (314). Psöriazis grubunun VLDL-K düzeyleri ise diyabet, metformin ve vardiya grubuna göre anlamlı derecede düşük saptandı. Bu bulgumuz bu grubun çoğunlukla genç ve VKİ'si düşük bireylerden oluşmasına bağlanabilir ve bu bireylerde muhtemelen insülin duyarlılığında bir etkilenme olmadığına işaret etmektedir.

Çalışmamızda Total-K düzeyleri incelendiğinde tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yapılan bir Framingham kohortunda diyabeti olmayan bireylerle diyabeti olan bireylerin serum Total-K düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (317). Yine yapılan başka bir araştırmada diyabetik ve nondiyabetik bireylerin serum Total-K seviyeleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (318). Bu durum aslında diyabetin patogenezinde yer aldığı ne sürülen biyolojik ritimlerde değişimlerin varlığı ve bununla birlikte lipoprotein metabolizması ve katabolizmasında yer alan proteinlerin de ritimlerinde değişimler olması, Total-K düzeylerini etkilemeden lipoprotein alt fraksiyonlarını etkilemesi nedeniyle veya beslenme, genetik bireysel varyasyonların farklılıklarıyla açıklanabilir.

Çalışmada tüm grupların serum lipidlerinin sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde:

Diyabet grubunun kontrole göre serum VLDL-K, LDL-K ve TG düzeyleri yüksekliği ve serum HDL-K düzeyleri düşük bulundu. Bu hiperlipidemik durum, Fredrickson sınıflamasına göre diyabetes mellitusa ve obeziteye sekonder Tip 4 hiperlipoproteinemi gelişmiş olabileceğini akla getirmektedir. Metformin grubunun kontrole göre serum VLDL-K ve TG düzeyleri yüksekliği tespit edilmiştir. Bu hiperlipidemik düzeyler, insülin direnci ve obezite varlığına bağlı ortaya çıkmış olabilir. Psöriazis grubunun serum TG düzeyleri ile VLDL-K düzeyleri kontrole göre daha düşük saptanmıştır. HDL-K düzeyleri de kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgularımız önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyumsuzdur. Psöriatik hastaların plazma lipid konsantrasyonları uzun süredir araştırma konusu olmuştur ve bu hastaların dislipidemi yönünde anormal kan lipid profili gösterdiği iyi bilinmektedir. Psöriaziste lipidleri araştıran çok sayıda çalışmanın büyük bir meta-analizi, LDL ve VLDL ile birlikte Total-K ve TG düzeylerinin, psöriatiklerde kontrol gruplarına göre anlamlı derecede yüksek olduğu sonucuna varmıştır. Öte yandan, psöriatik hastaların HDL-K konsantrasyonu önemli ölçüde düşük saptanmıştır (313). Psöriazis hastalığının şiddeti ile metabolik sendroma yakalanma riskinin korele olduğunu bildiren araştırmacılar da mevcuttur (234). Çalışmada psöriazis grubunun hiperlipidemik sonuçları; psöriazis grubunun diğer gruplara göre nispeten daha genç olması, VKİ değerlerinin düşük olması, hastalık şiddetinin az olması, diyet ve egzersiz alışkanlıkları ve genetik faktörlere atfedilebilir. Vardiya grubunun kontrole göre serum VLDL-K, TG düzeyleri yüksek ve HDL-K düzeyleri düşük saptanmıştır. Bu hiperlipidemik düzeyler, obeziteye sekonder Tip 4 hiperlipoproteinemi gelişmiş olabileceğine işaret etmektedir. Gruplar içerisinde sirkadiyen ritim bozukluğuna neden olan durumlar olan diyabet, metformin ve vardiya grubunun hiperlipidemik düzeylere bağlı olarak ateroskleroz ve KKH riskinin arttığı söylenebilir.

İnsanlarda plazma melatonin ve kortizol düzeyleri sirkadiyen ritim belirteçleridir. Merkezi sirkadiyen saatin, kortizolün ve melatoninin günlük osilasyonunu sağlayarak periferal saati senkronize ettiği bilinmektedir. Çalışmada serum melatonin seviyeleri açısından gruplar arasında belirgin farklılıklar tespit edildi. Vardiya grubunda kontrole ve diğer gruplara göre anlamlı bir artış bulundu. Bu durum Vardiya grubunda sirkadiyen ritimlerinde faz değişimi olabileceğine işaret etmektedir.

Gece vardiyasında çalışan bireyler gündüz saatleri dışında uyanık ve aktiftir; değişen uyku ve yeme düzenlerinden muzdariptirler ve geceleri ışığa maruz kalırlar. Bu tür koşullar, merkezi saat ile periferik saat arasında çatışmaya neden olabilir ve homeostaz kaybını tetikleyen sirkadiyen bozulmayı teşvik edebilir (30). Vardiyalı çalışanlarda idrar 6-sülfatoksimeatoninin toplam 24 saatlik ölçümlerinin yapıldığı bir çalışmada araştırmacılar, tüm çalışanlarda aynı olmakla birlikte toplam melatonin üretiminin azaldığını ve melatonin sentezinin normal uyku-uyanıklık döngüsünün tersine döndüğünü yani melatonin seviyelerinin gündüzleri daha yüksek ve geceleri daha düşük seyrettiğini bildirmişlerdir (277). Melatonin salgısındaki bu değişimler, aslında gece vardiyasında elektrik ışığı tarafından keskin bir şekilde bastırılan epifiz bezinin melatonin salgısının ışık kaynaklı inhibisyonudur. Gece boyunca oküler ışığa maruz kalma, melatonin üretimini geçici olarak engeller (269,278) ve melatonin düzeylerinin tepe ve dip düzeylerinde değişikliklere yol açar (272). Diyabet ve Metformin gruplarında ise melatonin kontrole ve diğer gruplara göre anlamlı derecede düşük bulundu. Bu durum sirkadiyen ritimlerde bozulma olmuş olabileceğini göstermektedir. Homozigot CLOCK mutant farelerde yapılan bir incelemede, fareler hiperfaji, hiperlipidemi, hiperglisemi, hepatik steatoz ve yetersiz insülin sekresyonundan oluşan metabolik sendrom fenotipi geliştirmişlerdir (78). Pankreasa özgü BMAL1 geni bozulmuş kemirgenlerde yapılan başka bir çalışmada mutant farelerde ise şiddetli glukoz intoleransı ve kusurlu insülin sekresyonu vardı (319). Bu bulgular bizim verilerimizle tutarlı görünmektedir ve merkezi ve periferik saatlerin glukoz homeostazisinde önemli bir rolü olduğunu destekler niteliktedir. Çalışmada bu veriler ışığında diyabet ve metformin gruplarının sirkadiyen ritimlerinin bozulmuş olabileceği söylenebilir. Ayrıca T2DM ve gece vardiyasının sebep oldukları faz kaymaları farklı olabilir. Çünkü vardiya grubunun serum melatonin düzeyleri kontrole göre yüksek iken T2DM ve metformin grubunun düşük bulundu. (Örn. Melatonin fazının öne (erken) gelmesi veya gecikmesi gibi). Psöriazis grubunun melatonin düzeyleri incelendiğinde kontrole göre anlamlı bir fark gözlenemedi. Bu durum psöriazis grubunda sirkadiyen ritim değişikliği olmadığına işaret etse de diyabet, metformin ve vardiya grubuna göre anlamlı bir farklılık bulundu. Bununla birlikte psöriazis patofizyolojisinin anormal sirkadiyen ritimlerle ilişkili olabileceğini öne süren birçok rapor bulunmaktadır (29,251). Kan basıncı, fizyolojik koşullarda geceleri daha düşük değerlerle seyreden sirkadiyen bir ritme sahiptir. Psöriatik hastalarda yapılan kan basıncı takipleri gece kan basıncının anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermiştir (29). Ayrıca psöriatik

hastalarda melatonin salgılanmasını değerlendiren bir çalışmada, melatoninin gece pik noktasını ve normal sirkadiyen ritmini kaybettiği gösterilmiştir (252).

Serum kortizol düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında önemli farklılıklar saptandı. Vardiya grubunda kontrol, metformin ve psöriazis grubuna göre anlamlı düzeyde artış vardı. Önemli bir sirkadiyen ritim belirteci olan kortizolün vardiya grubunda artması, bu grupta sirkadiyen ritimde faz değişimi olabileceğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bu grubun çalışma koşullarına bağlı olarak sosyal stres faktörüne maruz kaldığı düşünülürse kortizol, strese bağlı olarak da artmış olabilir. Araştırmacılar, kortizol ritmikliğinin; zihinsel, psikolojik veya fiziksel stres faktörlerinden (166) ve ayrıca egzersiz, yemek ve tütün gibi farklı faktörlerden etkilendiğini ve gün içinde kortizol seviyelerinde küçük zirvelere neden olduğunu bildirmişlerdir (168). Psöriazis grubunun kortizol düzeylerinde kontrole göre farklılık olmasa da diyabet ve vardiya grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Bu durum merkezi sirkadiyen ritimde bir faz kaymasına işaret edebilir ve psöriazis hastalığında, biyolojik saat etkilenmiş olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre melatonin kortizole göre daha iyi bir sirkadiyen faz belirteci gibi görünmektedir. Kortizol her ne kadar güçlü osilasyonlar gösterse de sentezi birçok stres faktörü tarafından değişmektedir.

Çalışmada serum sPLA₂ düzeylerinde tüm gruplarda kontrole göre istatistiksel anlamda bir farklılık saptanamadı. Fakat istatistiksel olarak anlamlı olmasa da serum sPLA₂ düzeylerinde vardiya ve psöriazis grubunda kontrole göre bir artış bulunmuştur. Farelerde yapılan lipidomik analizlere göre yağ asitlerinin (83) ve lizofosfolipidlerin (15) sirkadiyen varyasyon gösterdiği ortaya koyulmuştur. Ayrıca insanlarda yapılan başka bir çalışmada incelenen salınımlı metabolitlerin çoğunluğunu yağ asitlerinin oluşturduğu bildirilmiştir (81). Bu metabolitlerin üretiminden sorumlu esas enzimlerden birinin sPLA₂ olduğu bilinmektedir (15) ve bu durum sPLA₂'nin de mRNA düzeyinde karaciğerde sirkadiyen osilasyon göstermesi ile açıklanabilir (16,17). Salgılayıcı PLA₂'lerin, araşidonik asit bozunmasını uyararak prostanoidler ve lökotrienler tarafından proinflatuar sitokinlerin salınımı yoluyla astım, Crohn, ülseratif kolit, ateroskleroz ve tümör oluşumu gibi patogenezi inflamasyonla ilişkili birçok hastalıkta inflamasyonun başlatılmasına aracılık ettiği bilinmektedir. Akut respiratuvar distress sendromunda akciğer yüzey aktif maddeleri PC ve fosfatidilgliserolün sPLA₂ tarafından bozunmasıyla artan solunum bir iltihabı ve alveolar çöküş vardır. Aterosklerozun, salgısal PLA₂'nin özellikle de sPLA₂-III'ün artmış ekspresyonu ile de

ilişkilendirilmiştir. sPLA₂-III'ün lipolitik etkisiyle LDL partikülünün daha küçük hale geldiği ve ayrıca LDL yüklü makrofajlarda lipid damlacıklarının birikiminin indüklendiği ortaya koyulmuştur. Çalışmalar, oksidatif hasardan kaynaklanan koroner damarların aterosklerozunun bir sonucu olarak salgısal PLA₂'nin kan seviyeleri ile koroner arter hastalığı arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermiştir (149). Psöriazis hastalığı patogenezinde inflamasyon olması (229) ve vardiyalı çalışmada bozulmuş uyku-uyanıklık ve beslenme döngüsü zemininde inflamasyon artışının meydana geldiğinin bilinmesi (320) ve bu zeminde artan bir metabolik sendrom ve KKH riski, vardiya ve psöriazis grubunda diğer gruplara kıyasla yüksek düzeyde sPLA₂ düzeyleri ile bağlantılı olduğu düşünülebilir.

Çalışmada serum LCAT düzeyleri; diyabet, metformin ve psöriazis gruplarında kontrole göre anlamlı derecede düşük bulundu. Vardiya grubunda ise diyabet ve metformin gruplarına kıyasla serum LCAT düzeylerinde anlamlı derecede artış bulundu. LCAT, plazmada yüksek oranda HDL'ye bağlanır (112) ve serbest kolesterolden kolesterol ester oluşumun katalizleyerek ters kolesterol taşınımına önemli katkılar sağlar (113). Bu nedenle serum LCAT konsantrasyonları, serum HDL konsantrasyonlarının düşüşünden etkilenebilir. Ayrıca fare dokularında LCAT'in sirkadiyen osilasyon gösterdiği tespit edilmiştir (16). Buna bağlı olarak diyabet, metformin, psöriazis ve vardiya grubunda LCAT sirkadiyen fazında kayma olmuş olabilir ve buna bağlı olarak LCAT konsantrasyonları, ölçüm zamanından etkilenmiş olabilir. Örn. Diyabet grubunda LCAT fazı numune alım zamanından erken gelmişse düşük seviyelerin ölçülmesine neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda diyabet ve metformin gruplarının serum EL düzeyleri, kontrole göre anlamlı derecede düşmüştür. Vardiya ve psöriazis gruplarında da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrole göre düşük düzeyler saptanmıştır. Badellino ve ark. düşük HDL-K konsantrasyonu, yüksek serum TG konsantrasyonu, yüksek açlık glukoz, obezite ve hipertansiyon gibi bazı metabolik sendrom bulgularının yüksek plazma EL seviyeleri ile ilişkili olduğunu bildirmiştir (144). Oysa ki bulgularımıza göre serum EL seviyeleri psöriazis grubu haricinde diğer gruplarda metabolik sendrom bulguları olan yüksek AKŞ, yüksek TG ve yüksek VKİ değerleri ile negatif korelasyon göstermiştir. HDL-K düzeyleri ile herhangi bir korelasyon göstermemiştir. Önceki çalışmada EL düzeyleri, yeni geliştirilmiş bir ELISA metoduyla ölçülmüş, plazmalar 1:10 oranında PBS ile seyreltilmiş ve absorbanslar 490 nm'de ölçülmüştür. Bir grup

araştırmacı, serum ve plazma EL kütlesinin ölçümlerini kıyaslamış ve plazma EL kütlesinin, serumdakinin yaklaşık %80'ine denk geldiğini bildirmişlerdir (145). Çalışmamızda serum numuneleri kullanılmış olup absorbanslar 450 nm'de okutulmuştur. Bu farklılık, EL düzeylerinin ölçüm metodundan ve katılımcılarda plazma numunesi alınmış olmasından kaynaklanabilir.

Diyabet ve vardiya grubunda HDL-K düzeylerinde düşüş, TG düzeylerinde ise artış bulundu. EL düzeyleri ise diyabet, vardiya ve metformin gruplarında düşük saptandı. Birçok çalışma, EL ekspresyon düzeyi ile HDL-K düzeyi arasında ters bir bağlantıya işaret etmektedir. EL, aşırı eksprese edildiğinde, plazma HDL-K seviyelerinde önemli bir azalma olmuş (127), EL eksikliğinde ise HDL-K seviyelerinde belirgin bir yükselme olmuştur (130). EL ve HDL metabolizmasındaki rolüne yönelik yapılan in vitro, in vivo hayvan çalışmaları ve insanlarda yapılan çalışmalardan elde edilen kanıtlar EL enziminin HDL-K konsantrasyonlarını azalttığı yönünde, fakat mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir (321). Çalışmamızın sonuçlarına göre, EL düzeyleri ile HDL-K düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunamadı. Bu durum şöyle açıklanabilir: TG seviyesi yükseldikçe HDL-K düzeyi azalmaktadır. Diyabet ve vardiya grubunda TG seviyesi yüksek olduğu için HDL-K seviyelerindeki azalma nedeniyle diğer çalışmalar ışığında gelmesi muhtemel HDL-K'daki artış perdelenmiş olabilir. Bir diğer faktör ise Türk popülasyonunun genetik faktörlere bağlı olarak düşük HDL-K seviyelerine sahip olması olabilir (322).

Çalışmamızda PLTP düzeyleri incelendiğinde tüm grupların serum PLTP düzeyleri kontrole göre düşük bulundu. Yapılan bir hayvan çalışmasında, PLTP -/- farelerde hepatosit plazma membranlarında sfingomiyelin ve serbest kolesterol seviyelerinin azaldığı bulundu (109). Bir araştırmada, insan PLTP'sini aşırı eksprese eden transgenik farelerde daha düşük toplam HDL-K seviyelerine rağmen pre- β -HDL üretiminde artış gözlendiği belirtilmektedir (323). Diğer bir araştırmaya göre ise PLTP nakavt fare fenotipinin (Düşük HDL ve yüksek HDL olmayan kolesterol seviyeleri) HDL partikülünün tüm bileşenlerinde azalma görüldüğu belirtilmiştir (324). Bir sfingolipid olan S1P'nin PLTP aracılı, eritrositlerden HDL'ye aktarıldığı ve böylelikle PLTP'nin plazma ve HDL'deki S1P içeriğini etkilediği farelerde yapılan bir çalışmayla belirlenmiştir (325). Birlikte bu veriler ışığında PLTP'nin yüzey aktif bir protein olduğu, hem hücre membranlarının hem de lipoproteinlerin fosfolipid kompozisyonunda değişimlere yol açabileceği söylenebilir. Bu değişimler de

muhtemelen koagülasyon, inflamatuvar yanıt, obezite, insülin direnci, T2DM ve ateroskleroz gelişimi gibi çeşitli patolojilerin gelişimini etkileyebilir (326). Hem plazma lipidleri hem de PLTP'nin sirkadiyen osilasyon gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuş (16) ve sirkadiyen ritim bozukluklarında PLTP'nin düşük konsantrasyonlarda saptanması, bu durumlarda hem lipoprotein metabolizmasında hem de hücre membranları ve lipoproteinlerin fosfolipid kompozisyonlarında değişimlere yol açabilir.

Gliserofosfolipidler, hücre zarlarının ana bileşenlerini oluşturur ve birçok hücrenel ve fizyolojik süreçte sinyal molekülleri için öncü görevi görür. Fosfolipidler iki hidrofobik yağlı açıl zincirinden ve bir hidrofilik baş grubundan oluşur. Fosfolipidlerin yağ açıl kısımlarının zincir uzunluğu ve doygunluk derecesi esas olarak onların çeşitliliğine karar verir ve hücre zarlarının ve ilişkili hücrenel süreçlerin biyofiziksel özelliklerini belirler (327). Çalışmalar, çekirdek moleküler saatin, lipid metabolizmasında yer alan genleri aktive ederek veya baskılayarak, ya doğrudan ya da diğer transkripsiyon faktörlerinin döngüsünü düzenleyerek lipid metabolik yollarını düzenlediğini göstermektedir (77). Fare plazmasında tespit edilen 683 salınımlı lipid molekülünün, gliserolipidler (%57) ve gliserofosfolipidlerden (%18) oluştuğu tespit edilmiştir (83). Ayrıca insan kanında tanımlanan salınımlı lipid metabolitler arasında gliserofosfolipid (18:1) ve lizoPC (16:0) yer almıştır (82). İnsan plazmasında uyku kısıtlanmalı koşullarda insan ve ratlarda fosfolipidlerin yükseldiği en çok yükselenlerin ise PC, lizoPC, PE ve sfingomyelin (SM) olduğu belirtilmiştir (14). Tavşanların sabit aydınlatma koşulları altında tutulduğu bir araştırmada serumda PE, PI ve PS düzeylerinde azalma; PC, lizoPC ve SM düzeylerinde ise artma tespit edilmiştir (328). Psöriatik hastalarda yapılan bir başka çalışmada lizofosfatidik asit ve lizoPC gibi lizogliserofosfolipidlerin plazma konsantrasyonları önemli ölçüde artmış; gliserofosfolipidler arasında, fosfatidik asit konsantrasyonu önemli ölçüde artarken; PC ve PI önemli ölçüde azalmıştır (329). T2DM riskiyle ilişkili serum metabolitlerini hedefleyen geniş çaplı bir kohort çalışmasında diaçil-PC'ler (C32:1, C36:1, C38:3 ve C40:5) T2DM riski ile anlamlı düzeyde pozitif ilişkili; SM (C16:1), lizoPC (C18:2) ve açıl-alkil-PC'ler (C34:3, C40:6, C42:5, C44:4 ve C44:5) T2DM riski ile önemli ölçüde ters orantılı bulundu (330). Sirkadiyen varyasyon gösteren metabolitlerle uyku bozukluğu, psöriazis, T2DM, gece ışığına maruz kalma gibi sirkadiyen ritim bozukluklarına sebep olan durumlarda düzeyleri değişen metabolitlerin, fosfolipidler ve metabolitleri üzerinde örtüştüğü görülmektedir. Serum ise bir fosfolipid havuzu olarak

değerlendirilmiştir. Hem lipoprotein partikülleri hem de hücre membranındaki fosfolipidlerin serum ile PLTP, EL, LCAT ve sPLA₂ gibi proteinlerin aracılığıyla gerçekleşen karşılıklı bir etkileşimi serum fosfolipid havuzunu etkilediği kabul edilmektedir. Çalışmamızda grupların HPLC analizlerine göre serum kompozisyonundaki PE, PC1, PC2, PC3 yüzde değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. HPTLC analizlerine göre elde edilen verilere göre serum kompozisyonunda tespit edilen PE, PC, SM, PI+PS ve lizoPC yüzde değerleri açısından gruplar arası anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Sonuçlarımızda istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmayışı farklı sebeplere bağlı olabilir:

1- Her bireyin sirkadiyen ritim bozukluğuna verdiği tepkilerde büyük farklılıklar olabilir. İnsanların sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitlerinin pik yapma zamanı bireysel farklılıklar içermektedir (75). Her bir bireyin osilasyon zamanının farklı oluşu gruplar arasında yapılan kıyaslamalarda farklılıkların belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Farklı gruplara ait değerler bir araya getirilip bir ortalama alındığında bu farklılıklar birbiriyle örtüştüğünden bir fark varsa da gözlemlenememiş olabilir. Bu nedenle sirkadiyen ritim araştırmalarında sonuçlar bireysel olarak değerlendirilmelidir.

2- Membran fosfolipidleri veya serum fosfolipidleri yağ asidi içeriklerinden dolayı diyetle alıma bağlı olarak sirkadiyen osilasyon göstermektedir. Fakat serum fosfolipidleri sirkadiyen ritim bozuklukları bağlamında uzun vadeli bir biyobelirteç olmayabilir. Çünkü serum fosfolipidleri, günlük diyetten etkilenir ve gruplarda kontrole göre bir fark varsa da bu serum kompartmanındaki fosfolipid ölçümleriyle anlaşılabilir.

3-Önceki çalışmalarda sirkadiyen ritim bozukluklarında düzeyleri değişen fosfolipid metabolitler farklı hastalık gruplarında, farklı hayvan modellerinde değerlendirilmiştir. Bu verileri doğrudan kıyaslamak doğru olmayabilir.

4- Fosfolipid metabolitlerin tespitinde kullanılan analitik metodların farklılığı, dedektör tipi (UV, flüoresans, vb.) gibi etkenler deteksiyon limitinin ve varyasyon derecelerinin farklı olmasına sebep olabilir ve sirkadiyen değişim gösteren metabolit değişimlerinin saptanamamasına neden olmuş olabilir.

5- Fosfolipidler oksidasyona duyarlı moleküllerdir. Her ne kadar numuneye antioksidan (BHT) eklenmişse de fosfolipidlerin yapısında bulunan çoklu doymamış

yağ asitleri serbest radikaller tarafından bir dizi kimyasal reaksiyona uğrattılır ve yağ asitleri parçalanır ve yağ asitleri yenilenecek membran fosfolipid kompozisyonunda değişimler olur. Bu değişiklikler de sirkadiyen değişim gösteren fosfolipidlerin saptanamamasına yol açabilir.

HDL'nin başlıca lipid bileşenleri; birçok biyolojik fonksiyona sahip fosfolipidler olan PC, sfingomiyelin ve lizoPC'dir ve ardından kolesterol ve kolesterol esterleri gelir. HDL ayrıca steroller, trigliseridler, yağda çözünen vitaminler, seramid, sfingosin-1-fosfat ve dihidrosfingosin-1-fosfat gibi diğer lipidleri de taşır. HDL'nin periferik dokulardan ve diğer lipoproteinlerden aldığı fazla kolesterol, HDL'ye bağlı LCAT kataliziyle kolesteril esterine dönüştürülür, karaciğere taşınır ve safra asitleri yoluyla vücuttan uzaklaştırılması sağlanır. HDL₂ düzeyleri ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık gelişimiyle yakın bağlantı içindedir (180). Son zamanlarda araştırmacılar HDL lipid içeriğinin vasküler hastalıklar, ateroskleroz, karaciğer yağlanması ve insülin direncinde önemli rolleri olabileceğine odaklanmıştır. İnsülin direnci, karaciğer yağlanması ve metabolik sendromda HDL'nin seramid içeriğinin önemli oranlarda arttığı bulunmuştur (331). Klinik çalışmalar, lipoprotein partiküllerinin lipid bileşimindeki spesifik değişikliklerin KKH'nin varlığı ve şiddeti ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Üç damar hastalığı olan hastaların HDL fraksiyonunda trigliserid yüzdesi, normal koroner arterleri olanlara göre anlamlı olarak daha yüksek, buna karşın kolesterol esterleri, PC ve sfingomiyelinin yanı sıra linoleik, araşidonik, aykoapentaenoik asit gibi PUFA'ların yüzdeleri önemli ölçüde daha düşük saptanmıştır (332). Psöriatik hastalardan elde edilen HDL'nin, önemli ölçüde azalmış toplam kolesterol, PC ve sfingomiyelin içeriği sergilediği ve bu değişimlerin düşük kolesterol akış kapasitesinin kilit bir belirleyicisi olduğu belirlenmiştir (333). Çalışmamızda ise tüm grupların HDL fraksiyonunda tespit ettiğimiz PE, PC1, PC2, PC3 fosfolipid yüzde değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. HPTLC analizlerine göre elde edilen verilere göre HDL fraksiyonunda tespit edilen PE, PC, SM, PI+PS ve lizoPC yüzde değerleri açısından gruplar arası anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Bu duruma birkaç faktör sebep olmuş olabilir:

1- PLTP, CETP, LCAT, sPLA₂ ve EL gibi plazma proteinleri, esasen HDL oluşumu, dönüşümü ve yeniden şekillenmesi sürecine dahil olur. Bu nedenle, bu proteinlerin aktivitesinde veya düzeylerindeki değişimler, HDL partiküllerinin plazma seviyesini ve bileşenlerini değiştirebilir (19). Bulgularımıza göre tüm gruplarda azalan

serum PLTP ve EL düzeyleri gözlenmektedir. Bu HDL'ye doğru azalan bir fosfolipid akışına sebep olabilir. sPLA₂'nin de HDL ve diğer lipoproteinlerin PC'lerini hidroliz ederek etki gösterdiği bilinmektedir. Grupların serum sPLA₂ düzeylerinde de anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Öte yandan tüm grupların azalan LCAT düzeylerine bağlı azalan bir fosfolipaz ve kolesterol esterifikasyon reaksiyonuna bağlı HDL fosfolipidlerinde bir artış ve azalan bir kolesterol ester içeriği gözlenebilir. Bu multifaktöriyel etkileşimler, birbirini nötralize etmiş olabilir.

2- Nascent HDL'nin iki kaynağı vardır: Birincisi, karaciğer ve bağırsak tarafından sekrete edilir. İkincisi ise HDL₂ oluşumuyla sonuçlanan trigliserid açısından zengin lipoprotein parçacıkları-şilomikronların ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin hidrolizidir. Her iki kaynak da diyetle alınan lipid türlerinden etkilenebilir ve dolayısıyla grupların diyet alışkanlıklarındaki farklılıklar, HDL fosfolipid içeriğini etkilemiş olabilir.

3- Çalışmamızda grupların sirkadiyen osilasyon gösteren fosfolipidlerinin toplam düzeyleri ölçülmüştür. Tespit edilen her bir fosfolipidin yağ açıl gruplarının karbon sayıları, çift bağ sayıları ve bileşimleri ayrı ayrı belirlenmediğinden grupların osilasyon gösteren fosfolipid düzeylerindeki farklılıklar tespit edilememiş olabilir. Örneğin, PC_{34:2} hem PC(18:1/16:1) hem de PC(18:2/16:0)'yi içerir. Biri artarken diğeri azalmışsa fark görülmemiş olabilir (75).

4- Katılımcılar poliklinik hastaları ve hastane personelinden oluştuğu için tüm gruplarda kan numunesi aynı saatte alınamamıştır ama yine de kan alımları saat 08:00-12:00 arasında gerçekleştirildi. Bu durum, grupların sirkadiyen osilasyon gösteren fosfolipidleri kıyaslarken var olan farklılıkları atlamamıza sebep olmuş olabilir. Bununla birlikte numune alım zamanı sabit olsa bile katılımcıların farklı sirkadiyen metabolik fenotipler olması ve buna bağlı sirkadiyen osilasyon gösteren metabolitlerinin zamanlaması ve amplitüdlerinde farklılıklar olabilir (80). Bütün bu etkenler grupların HDL fosfolipid değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına sebep olmuş olabilir.

HPLC analizlerinde eritrosit membranında PS, PE, PC₁, PC₂, PC₃ ve PC₄ fosfolipidleri tespit edilmiştir. PC'ler yağ asidi kompozisyonu açısından çeşitlilik gösteren fosfolipidlerdir. Bu çalışmada PC₄ serum ve HDL fraksiyonunda tespit edilmedi. Fakat eritrosit membranında saptandı. Muhtemelen PC₄, serum ve HDL

fraksiyonunda düşük oranlarda, eritrosit membranında yüksek oranlarda bulunan, farklı yağ asidine sahip bir diğer PC alt türü olabilir. Bu çalışmada tüm grupların eritrosit membranında tespit edilen PS, PE, PC1, PC2, PC3 ve PC4 yüzde değerleri incelendiğinde sadece PC4'ün yüzde değerinin tüm gruplarda kontrole göre arttığı diğer fosfolipidlerde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı bulundu. HPTLC analizlerinde ise eritrosit membranında tespit edilen PE, PC, SM ve PS+PI yüzde değerlerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık saptanmadı. HPTLC analizinde tespit edilen fakat HPLC'de tespit edilemeyen fosfolipid grupları olduğu görülmektedir. Bu farklılık, fosfolipidlerin düşük UV absorbansa sahip moleküller olması ve HPLC UV dedektörüyle düşük konsantrasyonlardaki fosfolipidlerin tespit edilememesine bağlı olabilir. Eritrositler oksijeni taşımaya daha elverişli bir hale gelmek için olgunlaştıklarında tüm organellerini kaybederler ve olgun halleri çekirdek, mitokondri, ribozom, vakuol ve endoplazmik retikulum içermez. Bu nedenle olgun eritrositler fosfolipid, TG, kolesterol ve yağ asidi de dahil *de novo* lipid sentezi yapamazlar. O halde eritrositler membran fosfolipidlerini onarma, yenileme ve değiştirme fonksiyonlarını nasıl gerçekleştirir:

1- Eritrositler, plazmayla devamlı etkileşim halindedir ve membran fosfolipidlerini yenilemenin en önemli yollarından birisi lipoproteinlerle fosfolipid değiş-tokuşudur. Bu değiş-tokuşun eritrosit membranının dış tabakasında cereyan ettiği ve insan ve rat eritrosit membranının dış tabakasının fosfolipid kompozisyonunun plazmayı yansıttığı düşünülmektedir (89). İnsan ve köpek türünde yapılan bir çalışmada plazma bileşikleri ile eritrosit membranı arasında PC ve sfingomiyelinin transfer edildiği; PE ve PS'nin ise daha stabil olduğu ifade edilmiştir (93). Bu değişim sPLA₂, EL, LCAT ve PLTP gibi hücre membranı-HDL lipid değişimini sağlayan proteinlerin fonksiyonu sonucunda gerçekleşmektedir (150,154,180,326). Bu enzimler eritrosit membranında yer alan fosfolipidlerin sn-1 veya sn-2 pozisyonunda bulunan bir açıl grubunun ayrılmasını katalizler ve serbest yağ asidi ve lizofosfolipidler açığa çıkar. Özellikle PLTP bu transfer mekanizmasında oldukça önemli bir rol oynayabilir. Çünkü PLTP serum-HDL-eritrosit membranı arasındaki lipid trafiğinde tam bir fosfolipid transferini sağlar fakat bu transfer mekanizmasının nasıl olduğu net değildir. Bu enzim düzeylerinin de sirkadiyen osilasyon gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (16,17). Dolayısıyla seçilen 4 farklı sirkadiyen ritim bozukluğu durumunda (Diyabet, metformin, psöriazis ve vardiya) LCAT, EL ve PLTP'nin kontrole göre

düşmesi ve buna bağlı muhtemel serum-HDL-eritrosit membranı arasında azalan bir fosfolipid trafiğine bağlı eritrosit membranı PC4 düzeyleri artmış olabilir.

2- Eritrosit membranı fosfolipid değişimine yol açan diğer bir faktör, eritrosit membranının asimetrisini sağlayan enzimleri etkileyen olaylardır. Eritrosit membranı da tıpkı hücre membranı gibi asimetrik fosfolipid dağılımına sahiptir. Eritrosit membranının dış yüzeyinde sıklıkla kolin içeren fosfolipidler (PC ve SM) lokalize olmuşken, sitoplazmik yüzeyde PS, PE gibi amin içeren fosfolipidler ve PI bulunur. Bu asimetri ise bazı özel enzimler sayesinde korunmaktadır. Bunlar flippase, scramblase ve floppase'lerdir. Floppase; PC'nin, PS ile iç yüzeyden dışa ters transferini kontrol eder. Flippase, amino içeren fosfolipidleri (PS, PE) dıştan iç yüzeye pompalar. Scramblase, eritrosit membranı boyunca konsantrasyon gradyentine bağlı enerjiden bağımsız bir şekilde nonspesifik çift yönlü fosfolipid taşınmasını başlatır (334). Bu enzimlerin aktivitesini etkileyen faktörler, eritrosit membranının fosfolipid kompozisyonunu değiştirmiş olabilir.

3- Eritrosit membranının fosfolipid kompozisyonun çeşitli patolojilerde, uzun süreli yaşam şekli değişiklikleri ve diyetel yağ asidi alımına bağlı değişim gösterdiği de bilinmektedir (94,335). Alzheimer'lı hastaların eritrositlerinde PS, PE ve etanolamin plazmalojen düzeylerinin SM'ye oranları kontrole göre düşük bulunmuştur (94). Orak hücre hastalığı veya talasemi gibi hemoglobinoopatilerde eritrosit membranının normal lipid bileşimi ve organizasyonu kaybolmuştur. Bu durumun da diğer kan hücreleri ve plazma bileşenleri ile etkileşim sonucu çeşitli patolojilere yol açtığı bilinmektedir (88). Sızma zeytinyağı ve hibrit palmiye yağının 3 ay tüketiminin insan eritrosit zarlarında PUFA'lar ile esterlenmiş PC ve PE türlerinin düzeylerinde bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (335). Çocuklarda eritrosit membran lipid kompozisyonunda sirkadiyen ritim bozukluğuna bağlı olarak eritrosit membran fosfolipid yağ asidi (n-3 PUFA'lar) kompozisyonunda uyku kısıtlamaları ile bağlantılı değişimler bildirilmiştir. Uyku bozukluğu olan katılımcılarda, uyku bozukluğu olmayanlara kıyasla daha yüksek oranlarda eritrosit fosfolipid 24:0, 24:1 n-9 ve toplam n-3 PUFA, 22:5 n-3 ve 22:6 n-3 oranlarının daha düşük olduğu bulundu (95). Metabolik sendromlu hastaların eritrosit zarlarındaki fraksiyonel lipid bileşiminin analizi, artan kolesterol, lizoPC, PS ve PE ve azalan sfingomiyelin ve PC içeriğini ortaya koymaktadır (336). Bu patolojiler dışında birçok hastalıkta membran lipid kompozisyonunun değiştiği gözlenmiştir. Bizim verilerimize göre sirkadiyen saatin bozulmasına bağlı olarak membran fonksiyonu

etkilenmiş ve buna bağlı membran fosfolipid kompozisyonu değişmiş olabilir. Sirkadiyen saat bozukluğu, bozulmuş lipid homeostazı, artmış oksidatif stres, endotel disfonksiyonu ve bozulmuş reseptör sinyalizasyonu da dahil olmak üzere fizyolojik süreçlerde aksamalara neden olmaktadır (77).

4- Serbest radikallerin hücre içi üretiminin, membran fosfolipid kompozisyonunu değiştirdiği bilinmektedir. Artan serbest radikaller farklı fosfolipid yapısında bulunan PUFA'ların çift bağlarıyla reaksiyona girerek apolar zincirlerde kutuplanma oluşturur. Oluşan bu yapı, fosfolipazlar tarafından tanınır ve onarım süreci başlar. Fosfolipidlerin ester bağı hidrolize uğrar ve lizofosfolipidler üretilir. Daha sonra Açıl-koenzim A transferaz ve Açıl-koenzim A sentetaz enzimlerinin yer aldığı deaçilasyon/reaçilasyon reaksiyonlarıyla diyete bağlı değişen plazma yağ asidi havuzundan bir yağ asidi alınır ve membran fosfolipidi yenilenir (337). Tüm bu süreçlerde yer alan proteinleri etkileyen ve serbest radikal üretimini arttıran faktörler, membran fosfolipid kompozisyonunun değişiminde etkili olabilir.

Çalışma sonuçlarını genel olarak değerlendirdiğimizde:

Diyabet, metformin ve vardiya gruplarında hiperlipidemi, psöriazis grubunda ise hipolipidemi gözlenmiştir. Bu durum; diyabet, metformin ve vardiya grubunda sirkadiyen ritim bozukluğu zemininde meydana gelen insülin direnci, T2DM, metabolik sendrom ve obezite gelişimine bağlı meydana gelmiş olabilir. Psöriazis grubunda hipolipidemi görülmesi ise, katılımcıların hastalığın erken evresinde olmaları ve sirkadiyen ritimlerinde henüz bir etkilenme olmamış olmasından ileri gelebilir.

Melatonin düzeyleri üzerine olan etkiler karşılaştırıldığında kontrole göre vardiya grubunda belirgin bir artış varken, diyabet ve metformin grubunda kontrole göre anlamlı bir düşüş gözlemlendi. Kortizol düzeyleri ise yine vardiya grubunda kontrole göre daha yüksekti. Sonuçlarımız, grupların sirkadiyen ritimlerinde faz kaymaları olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca verilerimize göre, kortizolden ziyade melatonin daha ideal bir sirkadiyen faz belirteci gibi görünmektedir.

Genel olarak sirkadiyen ritim bozukluğuna sebep olan durumlarda sirkadiyen osilasyon gösterdiği bilinen serum LCAT düzeyleri diyabet, metformin ve psöriazis grubunda belirgin olmak üzere vardiya grubunda da kontrole göre düşük bulundu. Serum EL düzeyleri ise diyabet ve metformin grubunda belirgin olmakla birlikte

psöriazis ve vardiya grubunda da kontrole göre düşük saptandı. Serum PLTP düzeylerinde tüm grupların düzeylerinde kontrole göre belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Serum sPLA₂ düzeylerinde ise gruplarda kontrole göre anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Tüm bu veriler ışığında sirkadiyen ritim bozukluğuna bağlı düzeyleri azalan serum LCAT, EL ve PLTP'nin serum-HDL-eritrosit membranı arasında fosfolipid trafiğinde azalmaya neden olabileceği söylenebilir.

Tespit edilen fosfolipidlerin imkanlar dahilinde olan metodlarla yağ asidi kompozisyonunun belirlenememesi, HPTLC metodunda yapılan fotodansitometrik spot analizlerde varyasyon oranlarının yüksekliği, tüm hastalardan aynı saatte kan alınamamış olması, seçilen hastaların yaş, cinsiyet ve VKİ değerleri açısından istenen ideal kriterleri taşınamaması ve gruplar arası farklılıkların olması ve ayrıca meydana gelen Covid-19 pandemisi nedeniyle kan numunelerinin toplanma sürecinde uzun süreli aksamalar yaşanması bu çalışmanın limitasyonlarını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada sirkadiyen ritim bozukluğu durumlarında serum ve HDL fosfolipid kompozisyonunda sirkadiyen osilasyon gösteren fosfolipid değerlerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Fakat eritrosit membran fosfolipid kompozisyonunda sirkadiyen osilasyon gösterdiği bilinen PC4 değerleri kontrole göre artmış bulundu. Seçilen 4 farklı durumun (T2DM, metformin, psöriazis ve vardiya) sirkadiyen ritim bozukluklarına yol açtığı bilinmektedir ve dolayısıyla sirkadiyen osilasyon gösteren ve serum-lipoprotein-eritrosit membranı arasında fosfolipid transferi yapan proteinlerin düzeylerinde ritim bozukluğuna bağlı düşüş görülmesi bu duruma sebep olmuş olabilir. Fosfolipid transferi yapan bu proteinlerin de ateroskleroz ve KKH patogeneğinde önemli rolleri olduğu bilinmektedir. Bu durum, sirkadiyen ritim bozuklukları ve ateroskleroz ve KKH gelişimi arasındaki bağlantının önemini ortaya çıkarmaktadır. Dolayısıyla PC4'ün veri analizleriyle (LC-MS/MS, GC-MS/MS) kompozisyonunun tanımlanması, eritrosit membranındaki fosfolipid kompozisyonunun analizi sirkadiyen ritim bozukluklarının teşhisinde önemli belirteçlerin bulunmasına katkıda bulunabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda diyabet, metformin ve vardiya grubunun serum lipid düzeyleri hiperlipidemik, psöriazis grubunun serum lipidleri ise hipolipidemik düzeylerde saptandı. Buna ilaveten gruplarda sPLA₂ düzeylerinde kontrole göre anlamlı bir farklılık bulunmadı. Serum LCAT düzeyleri diyabet, metformin, psöriazis grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşük saptanırken, vardiya grubunda ise anlamlı olmasa da kontrole göre düşük bulundu. Serum EL düzeyleri diyabet ve metformin grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşük saptanırken, psöriazis ve vardiya grubunda ise anlamlı olmasa da kontrole göre düşük saptandı. Serum PLTP düzeylerinde ise tüm gruplarda kontrole göre anlamlı derecede düşüş gözlemlendi.

Önemli bir sirkadiyen faz belirteci olan serum melatonin düzeyleri, diyabet ve metformin grubunda kontrole göre anlamlı derecede düşük, vardiya grubunda ise anlamlı derecede yüksek saptandı. Diğer bir sirkadiyen faz belirteci olan serum kortizol düzeyleri ise vardiya grubunda kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Serum ve HDL fosfolipid düzeylerinde tüm gruplarda kontrole göre anlamlı bir farklılık saptanmamışken, eritrosit membranı PC4 değerlerinde ise tüm gruplarda kontrole göre artışlar izlenmiştir.

Bu çalışmada yapılan analizler sonucunda sirkadiyen ritim bozukluklarının, serum-HDL-eritrosit membranı arasında fosfolipid trafiğinde rol alan proteinlerin düzeylerini değiştirerek lipid homeostazını etkileyebileceği ve bunun sonucunda T2DM, obezite, metabolik sendrom, ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık gelişimine zemin hazırlayabileceği söylenebilir. Dolayısıyla sirkadiyen ritim bozukluklarıyla bağlantılı olan bu hastalıklarda eritrosit membranı lipid kompozisyonu değişimlerinin takibi; bu hastalıkların klinik tanı ve tedavi takibi gibi klinik uygulamalarda faydalı bir biyobelirteç olarak kullanılabilmesi kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Serin Y, Tek NA. Effect of circadian rhythm on metabolic processes and the regulation of energy balance. *Ann Nutr Metab* 2019;74(4):322–30.
2. Annamneedi VP, Park JW, Lee GS, Kang TJ. Cell autonomous circadian systems and their relation to inflammation. *Biomol Ther* 2021;29(1):31–40.
3. Crosby P, Partch CL. New insights into non-transcriptional regulation of mammalian core clock proteins. *J Cell Sci* 2020;133(18):1–12.
4. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: Organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annual Review of Physiology* 2010;72: 517–49.
5. Güldür T, Otlu HG. Circadian rhythm in mammals: time to eat & time to sleep. *Biol Rhythm Res* 2017;48(2):243–61.
6. Vetter C. Circadian disruption: What do we actually mean? *Eur J Neurosci* 2020;1–31.
7. Potter GDM, Skene DJ, Arendt J, Cade JE, Grant PJ, Hardie LJ. Circadian rhythm and sleep disruption: Causes, metabolic consequences, and countermeasures. *Endocr Rev* 2016;37(6):584–608.
8. Bedrosian TA, Fonken LK, Nelson RJ. Endocrine effects of circadian disruption. *Annu Rev Physiol* 2016;78:109–31.
9. Foster RG, Peirson SN, Wulff K, Winnebeck E, Vetter C, Roenneberg T. Sleep and circadian rhythm disruption in social jetlag and mental illness. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013;119:325–46.
10. Roenneberg T, Allebrandt K V., Mellow M, Vetter C. Social jetlag and obesity. *Curr Biol* 2012;22(10):939–43.
11. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, Abramson L, Katz MN, Korem T, Zmora N, Kuperman Y, Biton I, Gilad S, Harmelin A, Shapiro H, Halpern Z, Segal E, Elinav E. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell* 2014;159(3):514–29.
12. Musiek ES, Holtzman DM. Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration. *Science* 2016;354(6315):1004–8.
13. Portaluppi F, Tiseo R, Smolensky MH, Hermida RC, Ayala DE, Fabbian F. Circadian rhythms and cardiovascular health. *Sleep Med Rev* 2012;16(2):151–66.
14. Weljie AM, Meerlo P, Goel N, Sengupta A, Kayser MS, Abel T, Birnbaum M,

Dinges DF, Sehgal A. Oxalic acid and diacylglycerol 36:3 are cross-species markers of sleep debt. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112(8):2569–74.

15. Ang JE, Revell V, Mann A, Mäntele S, Otway DT, Johnston JD, Thumser A, Skene DJ, Raynaud F. Identification of human plasma metabolites exhibiting time-of-day variation using an untargeted liquid chromatography-mass spectrometry metabolomic approach. *Chronobiol Int* 2012;29(7):868–81.

16. Yan J, Wang H, Liu Y, Shao C. Analysis of gene regulatory networks in the mammalian circadian rhythm. *PLoS Comput Biol* 2008;4(10):1–13.

17. Hughes ME, DiTacchio L, Hayes KR, Vollmers C, Pulivarthy S, Baggs JE, Panda S, Hogenesch JB. Harmonics of circadian gene transcription in mammals. *PLoS Genet* 2009;5(4):1–12.

18. Loizides-Mangold U, Perrin L, Vandereycken B, Betts JA, Walhin JP, Templeman I, Chanon S, Weger BD, Durand C, Robert M, Montoya JP, Moniatte M, Karagounis LG, Johnston JD, Gachon F, Lefai E, Riezman H, Dibner C. Lipidomics reveals diurnal lipid oscillations in human skeletal muscle persisting in cellular myotubes cultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114(41):8565–74.

19. Yazdanyar A, Yeang C, Jiang XC. Role of phospholipid transfer protein in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* 2011;13(3):242–8.

20. Trajkovska KT, Topuzovska S. High-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport: Strategies for raising HDL cholesterol. *Anatol J Cardiol* 2017;18(2):149–54.

21. Murakami M, Kudo I. Lipid phospholipase A2. *J Biochem* 2002;131(3):285–92.

22. Hirata KI, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T. Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem* 1999;274(20):14170–5.

23. Fuki IV., Blanchard N, Jin W, Marchadier DHL, Millar JS, Glick JM, Rader DJ. Endogenously produced endothelial lipase enhances binding and cellular processing of plasma lipoproteins via heparan sulfate proteoglycan-mediated pathway. *J Biol Chem* 2003;278(36):34331–8.

24. Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougrou C. Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol* 2017;15(3):434–43.

25. Dickmeis T. Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*

2009;200(1):3–22.

26. Skene DJ, Lockley SW, James K, Arendt J. Correlation between urinary cortisol and 6-sulphatoxymelatonin rhythms in field studies of blind subjects. *Clin Endocrinol* 1999;50(6):715–9.
27. Dantas-Ferreira RF, Raingard H, Dumont S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, Pevet P, Challet E. Melatonin potentiates the effects of metformin on glucose metabolism and food intake in high-fat-fed rats. *Endocrinol Diabetes Metab* 2018;1(4):1–10.
28. Barnea M, Haviv L, Gutman R, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Metformin affects the circadian clock and metabolic rhythms in a tissue-specific manner. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1822(11):1796–806.
29. Bacaksiz A, Vatankulu MA, Sonmez O, Erdogan E, Tasal A, Turfan M, Ertas G, Sevgili E, Dizman D, Onsun N. Non-dipping nocturnal blood pressure in psoriasis vulgaris. *Vienna Clin Wochenschr* 2012;124(23–24):822–9.
30. Escobar C, Salgado-Delgado R, Gonzalez-Guerra E, Osorio AT, Angeles-Castellanos M, Buijs RM. Circadian disruption leads to loss of homeostasis and disease. *Sleep Disord* 2011;2011:1–8.
31. Mason IC, Qian J, Adler GK, Scheer FAJL. Impact of circadian disruption on glucose metabolism: implications for type 2 diabetes. *Diabetologia* 2020;63(3):462–72.
32. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Ma S. Obesity and metabolic syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Ann Med* 2012;44(6):564–77.
33. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi RI, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* 2000;288(5466):682–5.
34. Mattis J, Sehgal A. Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging. *Trends Endocrinol Metab* 2016;27(4):192–203.
35. Nicolaides NC, Charmandari E, Chrousos GP, Kino T. Circadian endocrine rhythms: The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its actions. *Ann N Y Acad Sci* 2014;1318(1):71–80.
36. Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* 2001;63:647–76.
37. Hussain MM, Pan X. Clock regulation of dietary lipid absorption. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012;15(4):336–41.

38. de Castro JM, Stoerzinger A, Barkmeier D, Ellen P. Medial septal lesions: Disruptions of microregulatory patterns and circadian rhythmicity in rats. *J Comp Physiol Psychol* 1978;92(1):71–84.
39. Stevens RG, Rea MS. Light in the built environment: Potential role of circadian disruption in endocrine disruption and breast cancer. *Cancer Causes Control* 2001;12(3):279–87.
40. Sack RL, Lewy AJ. Treatment of circadian desynchrony in night workers and the blind sleep. *J Biol Rhythms* 1997;12(6):595–603.
41. Aschoff J. Circadian rhythms in man. *Science* 1965;148(6):1427–32.
42. Galdames HA, Torres-Farfan C, Spichiger C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Alonso-Vazquez P, Richter HG. Impact of gestational chronodisruption on fetal cardiac genomics. *J Mol Cell Cardiol* 2014;66:1–11.
43. Rüger M, Scheer F. Effects on circadian disruption on cardiometabolic system. *Rev Endocr Metab Disord* 2009;10(4):245–60.
44. Qian J, Scheer FA. Circadian system and glucose metabolism: Implications for physiology and disease. *Physiol Behav* 2016;27(5):282–93.
45. Albrecht U. Timing to Perfection: The biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron* 2012;74(2):246–60.
46. Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, Ronda JM. Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science* 1989;244(4910):1328–33.
47. Weitzman ED, Czeisler CA, Coleman RM, Spielman AJ, Zimmerman JC, Dement W, Richardson G, Pollak CP. Delayed sleep Phase Syndrome. *Arc Gen Psychiatry* 1981;38(7):737–46.
48. Wilson J, Reid KJ, Braun RI, Abbott SM, Zee PC. Habitual light exposure relative to circadian timing in delayed sleep-wake phase disorder. *Sleep* 2018;41(11):1–9.
49. Dagan Y, Eisenstein M. Circadian rhythm sleep disorders: Toward a more precise definition and diagnosis. *Chronobiol Int* 1999;16(2):213–22.
50. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, Besing RC, Menaker M, Gewirtz AT, Davidson AJ. Disregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol* 2010;185(10):5796–805.
51. Åkerstedt T. Shift work and disturbed sleep/wakefulness. *Occupational Medicine* 2003;53(2):89–94.

52. Drake CL, Roehrs T, Richardson G, Walsh JK, Roth T. Shift work sleep disorder: Prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers. *Sleep* 2004;27(8):1453–62.
53. Knutsson A. Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine* 2003;53(2):103–8.
54. Kroenke CH, Spiegelman D, Manson JA, Schernhammer ES, Colditz GA, Kawachi I. Work characteristics and incidence of type 2 diabetes in women. *Am J Epidemiol* 2007;165(2):175–83.
55. Buxton OM, Cain SW, O'Connor SP, Porter JH, Duffy JF, Wang W, Czeisler, Charles A, Shea, SA. Metabolic consequences in humans of prolonged sleep restriction combined with circadian disruption. *Sci Transl Med* 2012;4(129):1–19.
56. Gan Y, Yang C, Tong X, Sun H, Cong Y, Yin X, Li Li, Cao S, Dong X, Gong Y, Shi O, Deng J, Bi H, Lu, Z. Shift work and diabetes mellitus: A meta-analysis of observational studies. *Occup Environ Med* 2015;72(1):72–8.
57. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, Fuchs CS, Colditz, GA. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(11):825–8.
58. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Walter C, Willett, Hunter DJ, Kawachi I, Colditz GA. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the Nurses' Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93(20):1563–8.
59. Lahti TA, Partonen T, Kyrrönen P, Kauppinen T, Pukkala E. Night-time work predisposes to non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer*. 2008;123(9):2148–51.
60. Kubo T, Ozasa K, Mikami K, Wakai K, Fujino Y, Yoshiyuki W, Miki T, Nakao M, Hayashi K, Suzuki K, Mori M, Washio M, Sakauchi F, Ito Y, Yoshimura T, Tamakoshi A. Prospective cohort study of the risk of prostate cancer among rotating-shift workers: Findings from the Japan Collaborative cohort study. *Am J Epidemiol* 2006;164(6):549–55.
61. Bacquer D De, Risseghem M Van, E Clays FK, Backer G De, Braeckman L. Rotating shift work and the metabolic syndrome: A prospective study. *Int J Epidemiol* 2009;38(3):848–54.
62. Karlsson B, Alfredsson L, Knutsson A, Andersson E, Torén K. Total mortality and cause-specific mortality of Swedish shift- and dayworkers in the pulp and paper industry in 1952-2001. *Scand J Work Environ Heal* 2005;31(1):30–5.

63. Haupt CM, Alte D, Dörr M, Robinson DM, Felix SB, John U, Völzke H. The relation of exposure to shift work with atherosclerosis and myocardial infarction in a general population. *Atherosclerosis* 2008;201(1):205–11.
64. Foster RG, Wulff K. The rhythm of rest and excess. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(5):407–14.
65. LeGates T, Altimus C, Wang H, Lee H-K, Yang S, Zhao H, Kirkwood A, Weber T, Hattar S. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature* 2012;491(7425):594–8.
66. Herxheimer A. Jet lag. *BMJ Clin Evid* 2014;2014:1–16.
67. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Cardinali DP. Jet lag: Therapeutic use of melatonin and possible application of melatonin analogs. *Travel Med Infect Dis* 2008;6(1–2):17–28.
68. Wittmann M, Dinich J, Meroow M, Roenneberg T. Social jetlag: Misalignment of biological and social time. *Chronobiol Int* 2006;23(1–2):497–509.
69. Roenneberg T, Pilz LK, Zerbini G, Winnebeck EC. Chronotype and social jetlag: A (self-) critical review. *Biology* 2019;8(3):1–19.
70. Almoosawi S, Palla L, Walshe I, Vingeliene S, Ellis JG. Long sleep duration and social jetlag are associated inversely with a healthy dietary pattern in adults: Results from the UK national diet and nutrition survey rolling programme Y1–4. *Nutrients* 2018;10(9):1–20.
71. Arendt J. Biological rhythms during residence in polar regions. *Chronobiol Int* 2012;29(4):379–94.
72. Sack RL, Lewy AJ, Blood ML, Keith LD, Nakagawa H. Circadian rhythm abnormalities in totally blind people: Incidence and clinical significance *. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75(1):127–34.
73. Van Someren EJW. Circadian and sleep disturbances in the elderly. *Exp Gerontol* 2000;35(9–10):1229–37.
74. Harper DG, Volicer L, Stopa EG, McKee AC, Nitta M, Satlin A. Disturbance of endogenous circadian rhythm in aging and Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry* 2005;13(5):359–68.
75. Chua ECP, Shui G, Lee ITG, Lau P, Tan LC, Yeo SC, Lam BD, Bulchand S, Summers SA, Puvanendran K, Rozen SG, Wenk MR, Gooley JJ. Extensive diversity in circadian regulation of plasma lipids and evidence for different circadian metabolic phenotypes in humans. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110(35):14468–73.

76. Rey G, Cesbron F, Rougemont J, Reinke H, Brunner M, Naef F. Genome-wide and phase-specific DNA-binding rhythms of BMAL1 control circadian output functions in mouse liver. *PLoS Biol* 2011;9(2):1–18.
77. Gooley JJ, Chua ECP. Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics. *J Genet Genomics* 2014;41(5):231–50.
78. Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi J, Bass J. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* 2005;308(5724):1043–5.
79. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, Tezuka M, Kosuge Y, Ishige K, Ito Y, Komiyama K, Okamatsu-Ogura Y, Kimura K, Saito M. Deficient of a clock gene, brain and muscle arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One* 2011;6(9):1–10.
80. Gooley JJ. Circadian regulation of lipid metabolism. *Proc Nutr So.* 2016;75(4):440–50.
81. Dallmann R, Viola AU, Tarokh L, Cajochen C, Brown SA. The human circadian metabolome. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(7):2625–9.
82. Kasukawa T, Sugimoto M, Hida A, Minami Y, Mori M, Honma S, Mishima K, Soga T, Ueda HR. Human blood metabolite timetable indicates internal body time. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(37):15036–41.
83. Sprenger RR, Hermansson M, Neess D, Becciolini LS, Sørensen SB, Fagerberg R, Ecker J, Liebisch G, Jensen ON, Vance DE, Færgeman NJ, Klemm RW, Ejsing CS. Lipid molecular timeline profiling reveals diurnal crosstalk between the liver and circulation. *Cell Rep* 2021;34(5):108710.
84. Davies SK, Ang JE, Revell VL, Holmes B, Mann A, Robertson FP, Cui Nanyi Middleton B, Ackermann K, Kayser M, Thumser AE, Raynaud FI, Skene DJ. Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111(29):10761–6.
85. Möller-Levet CS, Archer SN, Bucca G, Laing EE, Slak A, Kabiljo R, Lo J C.Y., Santhi N, Von Schantz M, Smith CP, Dijk DJ. Effects of insufficient sleep on circadian rhythmicity and expression amplitude of the human blood transcriptome. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110(12).
86. Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, Yasui A, Van Der Horst, G T.J., Soga T, Ueda HR. Measurement of internal body time by blood metabolomics. *Proc Natl Acad Sci* 2009;106(24):9890–5.

87. Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, Nagano M, Nakahama K, Suzuki Y, Sugano S, Iino M, Shigeyoshi Y, Hashimoto S. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002;418(6897):534–9.
88. Kuypers FA. Membrane lipid alterations in hemoglobinopathies. *Am Soc Hematol* 2007;2007(1):68–73.
89. Renooij W, Golde LMG Van. The exchange of phospholipids between rat erythrocytes and plasma, and the translocation of phosphatidylcholine across the red cell membrane, are temperature dependent processes. *FEBS Lett* 1976;71(2):321–4.
90. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res* 2012;53:1783–99.
91. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004;95(8):764–72.
92. Engelmann W, Schrempf M. Membrane models for circadian rhythms. In: *Photochemical and photobiological reviews* Boston, MA, 1980:49–86.
93. Reed CF. Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog. *J Clin Invest* 1968;47(4):749–60.
94. Oma S, Mawatari S, Saito K, Wakana C, Tsuboi Y, Yamada T, Fujino T. Changes in phospholipid composition of erythrocyte membrane in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2012;2(1):298–303.
95. Tang J, Yan Y, Zheng JS, Mi J, Li D. Association between erythrocyte membrane phospholipid fatty acids and sleep disturbance in Chinese children and adolescents. *Nutrients* 2018;10(344):1–12.
96. Jiang X-C, Yu Y. The role of phospholipid transfer protein in the development of atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2021;23(3):1–15.
97. Albers JJ, Vuletic S, Cheung MC. Role of plasma phospholipid transfer protein in lipid and lipoprotein metabolism. *Bone* 2012;1821(3):345–57.
98. Chowaniec Z, Skoczyńska A. Plasma lipid transfer proteins: The role of PLTP and CETP in atherogenesis. *Adv Clin Exp Med* 2018;27(3):429–36.
99. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: Role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 2003;33(12):1051–69.
100. Jiang X-C. Impact of phospholipid transfer protein in lipid metabolism and

cardiovascular diseases. *Adv Exp Med Biol* 2020;1276(1):1–13.

101. Hattori H, Kujiraoka T, Egashira T, Saito E, Fujioka T, Takahashi S, Ito M, Cooper JA, Stepanova IP, Nanjee MN, Miller NE. Association of coronary heart disease with Pre- β -HDL concentrations in Japanese men. *Clin Chem* 2004;50(3):589–95.

102. Zhao X-M, Wang Y, Yu Y, Jiang H, Babinska A, Chen X-Y, He K-G, Min X-D, Han J-J, Yang C-X, Deng K, Xue J, Zhang X, Song G-H, Qin S-C, Jiang X-C. Plasma phospholipid transfer protein promotes platelet aggregation. *Thromb Haemost* 2018;118(12):2086–97.

103. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): An emerging role in “reverse lipopolysaccharide transport” and innate immunity. *Biochem Soc Trans* 2011;39(4):984–8.

104. Hailman E, Albers JJ, Wolfbauer G, Tu AY, Wright SD. Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein. *J Biol Chem* 1996;271(21):12172–8.

105. Mansuy M, Baille S, Canet G, Borie A, Cohen-Solal C, Vignes M, Perrier V, Chevallier N, Le Guern N, Deckert V, Lagrost L, Givalois L, Desrumaux C. Deletion of plasma phospholipid transfer protein (PLTP) increases microglial phagocytosis and reduces cerebral amyloid- β deposition in the J20 mouse model of Alzheimer’s disease. *Oncotarget* 2018;9(28):19688-19703.

106. Schlitt A, Bickel C, Thumma P, Blankenberg S, Rupprecht HJ, Meyer J, Jiang X-C. High plasma phospholipid transfer protein levels as a risk factor for coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(10):1857–62.

107. Robins SJ, Lyass A, Brocica RW, Massaro JM, Vasan RS. Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *Atherosclerosis* 2013;228(1):230–6.

108. Cavusoglu E, Marmur JD, Chhabra S, Hojjati MR, Yanamadala S, Chopra V, Eng C, Jiang X-C. Elevated baseline plasma phospholipid protein (PLTP) levels are an independent predictor of long-term all-cause mortality in patients with diabetes mellitus and known or suspected coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2015;239(2):503–8.

109. Song G, Zong C, Shao M, Yu Y, Liu Q, Wang H, Qiu T, Jiao P, Guo Z, Lee P, Luo Y, Jiang, XC, Qin S. Phospholipid transfer protein (PLTP) deficiency attenuates high fat diet induced obesity and insulin resistance. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2019;1864(10):1305–13.

110. Krapfenbauer K, Yoo BC, Kim SH, Cairns N, Lubec G. Differential display

reveals downregulation of the phospholipid transfer protein (PLTP) at the mRNA level in brains of patients with Down syndrome. *Life Sci* 2001;68(18):2169–79.

111. Gander R, Eller P, Kaser S, Theurl I, Walter D, Saupera T, Ritsch A, Patscha JR, Föger B. Molecular characterization of rabbit phospholipid transfer protein: Choroid plexus and ependyma synthesize high levels of phospholipid transfer protein. *J Lipid Res* 2002;43(4):636–45.

112. Rousset X, Shamburek R, Vaisman B, Amar M, Remaley AT. Lecithin cholesterol acyltransferase: An anti- or pro-atherogenic factor? *Curr Atheroscler Rep* 2011;13(3):249–56.

113. Cooke AL, Morris J, Melchior JT, Street SE, Gray Jerome W, Huang R, Herr AB, Smith LE, Segrest JP, Remaley AT, Shah AS, Thompson, TB, Davidson WS. A thumbwheel mechanism for APOA1 activation of LCAT activity in HDL. *J Lipid Res* 2018;59(7):1244–55.

114. Yokoyama K, Tani S, Matsuo R, Matsumoto N. Association of lecithin-cholesterol acyltransferase activity and low-density lipoprotein heterogeneity with atherosclerotic cardiovascular disease risk: A longitudinal pilot study. *BMC Cardiovasc Disord* 2018;18(1):1–6.

115. Dullaart RPF, Perton F, Sluiter WJ, De Vries R, Van Tol A. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase activity is elevated in metabolic syndrome and is an independent marker of increased carotid artery intima media thickness. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(12):4860–6.

116. Murakami T, Michelagnoli S, Longhi R, Gianfranceschi G, Pazzucconi F, Calabresi L, Sirtori CR, Franceschini G. Triglycerides are major determinants of cholesterol esterification/transfer and HDL remodeling in human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15(11):1819–28.

117. Temple WA, Nye ER, Herbison PG. Lecithin: cholesterol acyltransferase activity, plasma and lipoprotein lipids and obesity in men and women. *Atherosclerosis* 1979;34:319–27.

118. Suárez-García S, Caimari A, Del Bas JM, Suárez M, Arola L. Serum lysophospholipid levels are altered in dyslipidemic hamsters. *Sci Rep* 2017;7(1):1–14.

119. Tanaka SI, Fujioka Y, Tsujino T, Ishida T, Hirata KI. Impact of serum cholesterol esterification rates on the development of diabetes mellitus in a general population. *Lipids Health Dis* 2018;17(180):1–8.

120. Tanaka SI, Yasuda T, Ishida T, Fujioka Y, Tsujino T, Miki T, Hirata KI. Increased serum cholesterol esterification rates predict coronary heart disease and sudden death in a general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(5):1098–104.
121. Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC, Spertus JA, Costa, F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 2005;112(17):2735–52.
122. Marcel YL, Vezina C. Lecithin: cholesterol acyltransferase of human plasma. *J Biol Chem* 1973 Dec 1;248(23):8254–9.
123. Akanuma Y, Kuzuya T, Hayashi M, Ide T, Kuzuya N. Positive correlation of Serum lecithin: cholesterol acyltransferase activity with relative body weight. *Eur J Clin Invest* 1973;3(2):136–41.
124. Johannes FG, Svetcic J, Milner A, De Leo D. Lecithin:cholesterol acyl transfer rate in plasma and its relation to lipid and lipoprotein concentrations in primary hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1977;26(1):233–48.
125. Baumann J, Sevinsky C, Conklin DS. Lipid biology of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(10):1509–17.
126. Yu JE, Han SY, Wolfson B, Zhou Q. The role of endothelial lipase in lipid metabolism, inflammation and cancer. *Histol Histopathol* 2018;33(1):1–10.
127. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 1999;21(4):424–8.
128. Paradis É, Clavel S, Julien P, Murthy MRV, De Bilbao F, Arsenijevic D, Giannakopoulos P, Vallet P, Richard D. Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain: Regional distribution and selective induction following kainic acid-induced lesion and focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2004;15(2):312–25.
129. Hirata KI, Ishida T, Matsushita H, Tsao PS, Quertermous T. Regulated expression of endothelial cell-derived lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;272(1):90–3.
130. Choi SY, Hirata KI, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD. Endothelial lipase: A new lipase on the block. *J Lipid Res* 2002;43(11):1763–9.

131. Rooney SA. The Surfactant System and Lung Phospholipid Biochemistry. *Am Rev Respir Dis* 1985;131(3):439–60.
132. McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res* 2002;43(6):921–9.
133. Strauss JG, Zimmermann R, Hrzenjak A, Zhou Y, Kratky D, Levak-Frank S, Kostner GM, Zechner R, Frank S. Endothelial cell-derived lipase mediates uptake and binding of high-density lipoprotein (HDL) particles and the selective uptake of HDL-associated cholesterol esters independent of its enzymic activity. *Biochem J* 2002;368(1):69–79.
134. Yang P, Belikova NA, Billheimer J, Rader DJ, Hill JS, Subbaiah P V. Inhibition of endothelial lipase activity by sphingomyelin in the lipoproteins. *Bone* 2014;49(10):987–96.
135. Jung UJ, Torrejon C, Chang CL, Hamai H, Worgall TS, Deckelbaum RJ. Fatty acids regulate endothelial lipase and inflammatory markers in macrophages and in mouse aorta: a role for PPAR γ . *Arter Thromb Vasc Biol* 2012;32(12):2929–37.
136. Russel Ross. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *Int Congr Symp Ser - R Soc Med* 2000;340(2):115–26.
137. Azumi H, Hirata KI, Ishida T, Kojima Y, Rikitake Y, Takeuchi S, Inoue N, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Quertermous T, Yokoyama M. Immunohistochemical localization of endothelial cell-derived lipase in atherosclerotic human coronary arteries. *Cardiovasc Res* 2003;58(3):647–54.
138. Ballantyne CM, Olsson AG, Cook TJ, Mercuri MF, Pedersen TR, Kjekshus J. Influence of low high-density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy in 4S. *Circulation* 2001;104(25):3046–51.
139. Yasuda T, Hirata KI, Ishida T, Kojima Y, Tanaka H, Okada T, Quertermous T, Yokoyama M. Endothelial lipase is increased by inflammation and promotes LDL uptake in macrophages. *J Atheroscler Thromb* 2007;14(4):192–201.
140. Jin W, Sun GS, Marchadier D, Octaviani E, Glick JM, Rader DJ. Endothelial cells secrete triglyceride lipase and phospholipase activities in response to cytokines as a result of endothelial lipase. *Circ Res* 2003;92(6):644–50.
141. Cilingiroglu M, Ballantyne C. Endothelial lipase and cholesterol metabolism. *Curr Atheroscler Rep* 2004;6(2):126–30.

142. Badellino K, Dykhouse J, Wolfe M, Reilly M, Rader D. P284 Human plasma endothelial lipase levels correlate with Coronary Artery Calcification scores and parameters of metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol J Am Hear Assoc* 2004;24(5):394–405.
143. Lamarche B, Paradis ME. Endothelial lipase and the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(3):298–303.
144. Badellino KO, Wolfe ML, Reilly MP, Rader DJ. Endothelial lipase concentrations are increased in metabolic syndrome and associated with coronary atherosclerosis. *PLoS Med* 2006;3(2):0245–52.
145. Shiu SWM, Tan KCB, Huang Y, Wong Y. Type 2 diabetes mellitus and endothelial lipase. *Atherosclerosis* 2008;198(2):441–7.
146. Paradis ME, Badellino KO, Rader DJ, Deshaies Y, Couture P, Archer WR, Bergeron N, Lamarche B. Endothelial lipase is associated with inflammation in humans. *J Lipid Res* 2006;47(12):2808–13.
147. Shimokawa Y, Hirata KI, Ishida T, Kojima Y, Inoue N, Quertermous T, Yokoyama M. Increased expression of endothelial lipase in rat models of hypertension. *Cardiovasc Res* 2005;66(3):594–600.
148. Burke JE, Dennis EA. Phospholipase A 2 structure/function, mechanism, and signaling. *J Lipid Res* 2009;50:237–42.
149. Casale J, Kacimi S, Varacallo M. Biochemistry, Phospholipase A2. In: *StatPearls*. StatPearls Publishing; 2021.
150. Murakami M, Taketomi Y. Secreted phospholipase A2 and mast cells. *Allergol Int* 2015;64(1):4–10.
151. Quach ND, Arnold RD, Cummings BS. Secretory phospholipase A2 enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. *Biochem Pharmacol* 2014;90(4):338–48.
152. Jerman B, Pungercar J. Secretory phospholipases A2 and their (patho) physiological role. *Pharm J* 2008;59(1):9–15.
153. Sato H, Kato R, Isogai Y, Saka GI, Ohtsuki M, Taketomi Y, Yamamoto K, Tsutsumi K, Yamada J, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Kobayashi T, Ikeda K, Taguchi R, Hatakeyama S, Hara S, Kudo I, Itabe H, Murakami M. Analyses of group III secreted phospholipase A2 transgenic mice reveal potential participation of this enzyme in plasma lipoprotein modification, macrophage foam cell formation, and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2008;283(48):33483–97.

154. Yasuda T, Ishida T, Rader DJ. Update on the role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport, and atherosclerosis. *Circ J* 2010;74(11):2263–70.
155. Amaral FG Do, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. *Arch Endocrinol Metab* 2018;62(4):472–9.
156. Meng X, Li Y, Li S, Zhou Y, Gan RY, Xu DP, Li, HB. Dietary sources and bioactivities of melatonin. *Nutrients* 2017;9(4):1–64.
157. Esposito S, Laino D, D’Alonzo R, Mencarelli A, Di Genova L, Fattorusso A, Argentiero A, Mencaroni E. Pediatric sleep disturbances and treatment with melatonin. *J Transl Med* 2019;17(1):1–8.
158. Li Y, Li S, Zhou Y, Meng X, Zhang JJ, Xu DP, Li HB. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* 2017;8(24):39896–921.
159. Zisapel N. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol* 2018;175(16):3190–9.
160. Azmi NASM, Juliana N, Azmani S, Effendy NM, Abu IF, Teng NIMF, Das S. Cortisol on circadian rhythm and its effect on cardiovascular system. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18(2):1–15.
161. Fries E, Dettenborn L, Kirschbaum C. The cortisol awakening response (CAR): Facts and future directions. *Int J Psychophysiol* 2009;72(1):67–73.
162. Timmermans S, Souffriau J, Libert C. A general introduction to glucocorticoid biology. *Front Immunol* 2019;10:1–17.
163. Pruessner JC, Wolf OT, Hellhammer DH, Buske-Kirschbaum A, Von Auer K, Jobst S, Kaspers F, Kirschbaum C. Free cortisol levels after awakening: A reliable biological marker for the assessment of adrenocortical activity. *Life Sci* 1997;61(26):2539–49.
164. Jung C, Greco S, Nguyen HHT, Ho JT, Lewis JG, Torpy DJ, Inder WJ. Plasma, salivary and urinary cortisol levels following physiological and stress doses of hydrocortisone in normal volunteers. *BMC Endocr Disord* 2014;14(1):1–10.
165. Teruhisa U, Ryoji H, Taisuke I, Tatsuya S, Fumihiro M, Tatsuo S. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta* 1981;110(2–3):245–53.
166. Chiang JJ, Ko A, Bower JE, Taylor SE, Irwin MR, Fuligni AJ. Stress, psychological resources, and HPA and inflammatory reactivity during late adolescence. *Dev Psychopathol* 2019;31(2):699–712.

167. Mustoe AC, Birnie AK, Korgan AC, Santo JB, French JA. Natural variation in gestational cortisol is associated with patterns of growth in marmoset monkeys (*Callithrix geoffroyi*). *Gen Comp Endocrinol* 2012;175(3):519–26.
168. Gallagher TF, Yoshida K, Roffwarg HD, Fukushima DK, Weitzman ED, Hellman L. ACTH and cortisol secretory patterns in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36(6):1058–68.
169. Klerman EB, Gershengorn HB, Duffy JF, Kronauer RE. Comparisons of the variability of three markers of the human circadian pacemaker. *J Biol Rhythms* 2002;17(2):181–93.
170. Wilhelm I, Born J, Kudielka BM, Schlotz W, Wüst S. Is the cortisol awakening rise a response to awakening? *Psychoneuroendocrinology* 2007;32(4):358–66.
171. Evanson NK, Herman JP, Sakai RR, Krause EG. Nongenomic actions of adrenal steroids in the central nervous system. *Physiol Behav* 2010;22(8):846–61.
172. Eismann EA, Lush E, Sephton SE. Circadian effects in cancer-relevant psychoneuroendocrine and immune pathways. *Psychoneuroendocrinology* 2010;35(7):963–76.
173. Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-night salivary cortisol measurement in the diagnosis of Cushing's syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(6):344–50.
174. Bao AM, Meynen G, Swaab DF. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev* 2008;57(2):531–53.
175. Kumari M, Badrick E, Chandola T, Adam EK, Stafford M, Marmot MG, Kirschbaum C, Kivimaki M. Cortisol secretion and fatigue: Associations in a community based cohort. *Psychoneuroendocrinology* 2009;34(10):1476–85.
176. Matthews K, Schwartz J, Cohen S, Seeman T. Diurnal cortisol decline is related to coronary calcification: CARDIA study. *Psychosom Med* 2006;68(5):657–61.
177. Ferrari E, Casarotti D, Muzzoni B, Albertelli N, Cravello L, Fioravanti M, Solerte SB, Magri F. Age-related changes of the adrenal secretory pattern: Possible role in pathological brain aging. *Brain Res Rev* 2001;37(1–3):294–300.
178. Pasquali R, Vicennati V, Cacciari M, Pagotto U. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in obesity and the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1083:111–28.
179. Sephton SE, Sapolsky RM, Kraemer HC, Spiegel D. Diurnal cortisol rhythm as a predictor of breast cancer survival. *Brain Behav Immun* 2000;92(10):994–1000.

180. Kunnen S, Van Eck M. Lecithin:cholesterol acyltransferase: Old friend or foe in atherosclerosis? *J Lipid Res* 2012;53(9):1783–99.
181. Kuo T, McQueen A, Chen T-C, Wang J-C. Regulation of glucose homeostasis by glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol* 2015;872:100–26.
182. Adam EK, Quinn ME, Tavernier R, McQuillan MT, Dahlke KA, Gilbert KE. Diurnal cortisol slopes and mental and physical health outcomes: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 2017;83(1):25–41.
183. Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. Stress may add bite to appetite in women: A laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26(1):37–49.
184. De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: From adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(6):463–75.
185. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev* 2007;87(3):873–904.
186. Dahl RE, Ryan ND, Puig-Antich J, Nguyen NA, Al-Shabbout M, Meyer VA, Perel J. 24-Hour cortisol measures in adolescents with major depression: A controlled study. *Biol Psychiatry* 1991;30(1):25–36.
187. Sephton S, Spiegel D. Circadian disruption in cancer: A neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun* 2003;17(5):321–8.
188. Webster JI, Tonelli L, Sternberg EM. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 2002;20(20):125–63.
189. HCS H, CJ B. Galegine and antidiabetic plants. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, Davidson JA, Howlett HCS RP (eds). *Metformin—the gold standard*, Chichester: Wiley; 2007:3–9.
190. Müller H, Reinwein H. On the pharmacology of galegins. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives for Experimental Pathology and Pharmacology* 1927;1927(125):212–28.
191. HCS H, CJ B. Galegine and antidiabetic plants. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, Davidson JA, Howlett HCS RP, (eds). *Metformin—the gold standard*, Chichester; Wiley; 2007:11–6.
192. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 2017;60(9):1577–85.
193. Henriksson E, Huber A-L, Soto E, Kriebs A, Vaughan M, Duglan D, Chan A, Papp S, Nguyen M, Afetian M, Lamia K. The liver circadian clock modulates

- biochemical and physiological responses to metformin. *J Biol Rhythm* 2017;32(4):345–58.
194. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. *Cancer Discov* 2012;2(9):778–90.
195. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview. *Clin Sci* 2012;122(6):253–70.
196. Scheen AJ. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 1996;30(5):359–71.
197. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet* 2011;50(2):81–98.
198. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, Ianculescu AG, Yue L, Lo JC, Burchard EG, Brett CM, Giacomini KM. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest* 2007;117(5):1422–31.
199. Stephenne X, Foretz M, Taleux N, Van Der Zon GC, Sokal E, Hue L, Viollet B, Guigas B. Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 2011;54(12):3101–10.
200. El-Mir MY, Nogueira V, Fontaine E, Avéret N, Rigoulet M, Leverve X. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 2000;275(1):223–8.
201. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 2000;348(3):607–14.
202. Kim YD, Park K, Lee Y, Park Y, Kim D, Nedumaran B, Jang WG, Cho W, Ha J, Lee I, Lee, C, Choi H. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* 2008;57:306–14.
203. Vieira E. The impact of metformin on circadian clock genes. *J Diabetes, Metab Disord Control* 2014;1(3):77–9.
204. Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 2005;1(1):15–25.
205. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M,

- Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller, DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 2001;108(8):1167–74.
206. Yoon MJ, Lee GY, Chung J-J, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor{alpha}. *Diabetes* 2006;55(9):2562–70.
207. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, Park SH, Uhm KO, Kim HS. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol* 2011;226(4):974–81.
208. Lv WS, Wen JP, Li L, Sun RX, Wang J, Xian YX, Cao CX, Wang YL, Gao YY. The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats. *Brain Res* 2012;1444:11–9.
209. Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim Y-B, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, Stuck BJ, Kahn BB. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004;428:569–74.
210. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, Dickinson R, Adler A, Gagne G, Iyengar R, Zhao G, Marsh K, Kym P, Jung P, Camp HS, Frevert E. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab* 2006;3(6):403–16.
211. Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000;6(9):998–1003.
212. Raso GM, Esposito E, Iacono A, Pacilio M, Cuzzocrea S, Canani RB, Calignano A, Meli R. Comparative therapeutic effects of metformin and vitamin E in a model of non-alcoholic steatohepatitis in the young rat. *Eur J Pharmacol* 2009;604(1–3):125–31.
213. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001;358(9285):893–4.
214. Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest* 2010;120(7):2355–69.

215. Gunton JE, Delhanty PJD, Takahashi SI, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(3):1323–32.
216. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: An update. *Ann Intern Med* 2002;137(1):25–33.
217. Muller S, Denet S, Candiloros H, Barrois R, Wiernsperger N, Donner M, Drouin P. Action of metformin on erythrocyte membrane fluidity in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 1997;337(1):103–10.
218. Takiyama Y, Harumi T, Watanabe J, Fujita Y, Honjo J, Shimizu N, Makino Y, Haneda M. Tubular injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin: A possible role of HIF-1 α expression and oxygen metabolism. *Diabetes* 2011;60(3):981–92.
219. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998;352(9131):854–65.
220. Johnson JA, Majumdar SR, Simpson SH, Toth EL. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2002;25(12):2244–8.
221. Johnson JA, Simpson SH, Toth EL, Majumdar SR. Reduced cardiovascular morbidity and mortality associated with metformin use in subjects with Type 2 diabetes. *Diabet Med* 2005;22(4):497–502.
222. Um JH, Yang S, Yamazaki S, Kang H, Viollet B, Foretz M, Chung JH. Activation of 5'-AMP-activated kinase with diabetes drug metformin induces casein kinase I ϵ (CKI ϵ)-dependent degradation of clock protein mPer2. *J Biol Chem* 2007;282(29):20794–8.
223. Lamia KA, Sachdeva UM, Di Tacchio L, Williams EC, Alvarez JG, Egan DF, Vasquez DS, Juguilon H, Panda S, Shaw RJ, Thompson CB, Evans RM. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science* 2009;326(5951):437–40.
224. Eide EJ, Woolf MF, Kang H, Woolf P, Hurst W, Camacho F, Vielhaber EL, Giovanni A, Virshup DM. Control of mammalian circadian rhythm by CKI ϵ -regulated proteasome-mediated PER2 degradation. *Mol Cell Biol* 2005;25(7):2795–807.
225. Vielhaber E, Eide E, Rivers A, Gao Z-H, Virshup DM. Nuclear entry of the circadian eegulator mPER1 Is controlled by mammalian casein Kinase I ϵ . *Mol Cell*

Biol 2000;20(13):4888–99.

226. Barnea M, Cohen-Yogev T, Chapnik N, Madar Z, Froy O. Effect of metformin and lipid emulsion on the circadian gene expression in muscle cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2014;53(2014):151–61.
227. Menassol JB, Tautou C, Collet A, Chesneau D, Lomet D, Dupont J, Malpoux B, Scaramuzzi RJ. The effect of an intracerebroventricular injection of metformin or AICAR on the plasma concentrations of melatonin in the ewe: Potential involvement of AMPK? *BMC Neurosci* 2011;12(76):1–8.
228. Thomas AP, Hoang J, Vongbunyong K, Nguyen A, Rakshit K, Matveyenko AV. Administration of melatonin and metformin prevents deleterious effects of circadian disruption and obesity in male rats. *Endocrinology* 2016;157(12):4720–31.
229. Hirotsu C, Rydlewski M, Araújo MS, Tufik S, Andersen ML. Sleep loss and cytokines levels in an experimental model of psoriasis. *PLoS One* 2012;7(11):1–9.
230. Ando N, Nakamura Y, Aoki R, Ishimaru K, Ogawa H, Okumura K, Shibata S, Shimada S, Nakao A. Circadian gene clock regulates psoriasis-like skin inflammation in mice. *J Invest Dermatol* 2015;135(12):3001–8.
231. Leibowitz E, Seidman DS, Laor A, Shapiro Y, Epstein Y. Are psoriatic patients at risk of heat intolerance? *Br J Dermatol* 1991;124(5):439–42.
232. Plikus M V., Van Spyk EN, Pham K, Geyfman M, Kumar V, Takahashi JS, Andersen, B. The circadian clock in skin: Implications for adult stem cells, tissue regeneration, cancer, aging, and immunity. *J Biol Rhythms* 2015;30(3):163–82.
233. Lyons AB, Moy L, Moy R, Tung R. Circadian rhythm and the skin: A review of the literature. *J Clin Aesthet Dermatol* 2019;12(9):42–5.
234. Armstrong AW, Harskamp CT, Armstrong EJ. Psoriasis and metabolic syndrome: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Am Acad Dermatol* 2013;68(4):654–62.
235. Jensen P, Zachariae C, Christensen R, Geiker NRW, Schaadt BK, Stender S, Hansen PR, Astrup A, Skov L. Effect of weight loss on the severity of psoriasis: A randomized clinical study. *JAMA Dermatology* 2013;149(7):795–801.
236. Shi SQ, Ansari TS, McGuinness OP, Wasserman DH, Johnson CH. Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Curr Biol* 2013;23(5):372–81.
237. Geyfman M, Andersen B. How the skin can tell time. *J Invest Dermatol* 2009;129(5):1063–6.
238. Zanello SB, Jackson DM, Holick MF. Expression of the circadian clock genes

- clock and period1 in human skin. *J Invest Dermatol* 2000;115(4):757–60.
239. Bjarnason GA, Jordan RCK, Wood PA, Li Q, Lincoln DW, Sothorn RB, Hrushesky WJM, Ben-David Y. Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: Association with specific cell-cycle phases. *Am J Pathol* 2001;158(5):1793–801.
240. Frenzt G, Møller U, Hölmich P, Christensen IJ. On circadian rhythms in human epidermal cell proliferation. *Acta Derm Venereol* 1991;71(1):85–7.
241. Yosipovitch G, Xiong GL, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, Maibach HI. Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: Transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J Invest Dermatol* 1998;110(1):20–3.
242. Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, Nishigori C, Okamura H. Molecular clocks in mouse skin. *J Invest Dermatol* 2009;129(5):1225–31.
243. Geyfman M, Kumar V, Liu Q, Ruiz R, Gordon W, Espitia F, Cam E, Millar SE, Smyth P. Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1) controls circadian cell proliferation and susceptibility to UVB-induced DNA damage in the epidermis. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109(29):11758–63.
244. Zagula-Mally, Z. W. C, S. S. W, D., Simpson H, Reinberg A. Time point differences in skin mitotic activity of actinic keratoses and skin cancers. *Chronopharmacology* 1979;399–402.
245. Gupta MA, Gupta AK. Sleep-wake disorders and dermatology. *Clinics in Dermatology* 2013;31:118–26.
246. Weiss SC, Rowell R, Krochmal L. Impact of seasonality on conducting clinical studies in dermatology. *Clin Dermatol* 2008;26(5):565–9.
247. Pascoe VL, Kimball AB. Seasonal variation of acne and psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2015;73(3):523–5.
248. Ferguson FJ, Lada G, Hunter HJA, Bundy C, Henry AL, Griffiths CEM, Kleyn CE. Diurnal and seasonal variation in psoriasis symptoms. *J Eur Acad Dermatology Venereol* 2021;35(1):45–7.
249. Dopico XC, Evangelou M, Ferreira RC, Guo H, Pekalski ML, Smyth DJ, Cooper N, Burren OS, Fulford AJ. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun* 2015;6:1–13.
250. Balato N, Di Costanzo L, Patrino C, Patrì A, Ayala F. Effect of weather and environmental factors on the clinical course of psoriasis. *Occup Environ Med*

2013;70(8):600.

251. Gelfant S, Ozawa A, Chalker DK, Smith JG. Circadian rhythms and differences in epidermal and in dermal cell proliferation in uninvolved and involved psoriatic skin in vivo. *J Invest Dermatol* 1982;78(1):58–62.
252. Mozzanica N, Tadini G, Radaelli A, Negri M, Pigatto P, Morelli M, Frigerio U, Finzi A, Esposti G, Rossi D. Plasma melatonin levels in psoriasis. *Acta Derm Venereol* 1988;68(4):312–6.
253. Li W, Qureshi AA, Schernhammer ES, Han J. Rotating night shift work and risk of psoriasis in US women. *J Invest Dermatol* 2013;133(2):565–7.
254. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: Recent advances on IL-23 and TH17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2007;9(6):461–7.
255. Chiricozzi A, Saraceno R, Chimenti MS, Guttman-Yassky E, Krueger JG. Role of IL-23 in the pathogenesis of psoriasis: A novel potential therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* 2014;18(5):513–25.
256. Kikly K, Liu L, Na S, Sedgwick JD. The IL-23/Th17 axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation. *Curr Opin Immunol* 2006;18(6):670–5.
257. Chiu H-Y, Hsieh C-F, Chiang Y-T, Tsai Y-W, Huang W-F, Li C-Y, Wang T-S, Tsai T-F. Concomitant sleep disorders significantly increase the risk of cardiovascular disease in patients with psoriasis. *PLoS One* 2016;11(1):1–10.
258. Ruiz FS, Andersen ML, Martins RCS, Zager A, Lopes JD, Tufik S. Immune alterations after selective rapid eye movement or total sleep deprivation in healthy male volunteers. *Innate Immun* 2012;18(1):44–54.
259. van Leeuwen WMA, Lehto M, Karisola P, Lindholm H, Luukkonen R, Sallinen M, Härmä M, Porkka-Heiskanen T, Alenius H. Sleep restriction increases the risk of developing cardiovascular diseases by augmenting proinflammatory responses through IL-17 and CRP. *PLoS One* 2009;4(2):1–7.
260. Zager A, Ruiz FS, Tufik S, Andersen ML. Immune outcomes of paradoxical sleep deprivation on cellular distribution in naive and lipopolysaccharide-stimulated mice. *Neuroimmunomodulation* 2012;19(2):79–87.
261. Benedict C, Dimitrov S, Marshall L, Born J. Sleep enhances serum interleukin-7 concentrations in humans. *Brain Behav Immun* 2007;21(8):1058–62.

262. Reis ES, Lange T, Köhl G, Herrmann A, Tschulakow A V., Naujoks J, Born J, Köhl J. Sleep and circadian rhythm regulate circulating complement factors and immunoregulatory properties of C5a. *Brain Behav Immun* 2011;25(7):1416–26.
263. Dimitrov S, Lange T, Tieken S, Fehm HL, Born J. Sleep associated regulation of T helper 1/T helper 2 cytokine balance in humans. *Brain Behav Immun* 2004;18(4):341–8.
264. Langley RGB, Krueger GG, Griffiths CEM. Psoriasis: Epidemiology, clinical features, and quality of life. *Ann Rheum Dis* 2005;64:18–23.
265. Araujo P, Mazaro-Costa R, Tufik S, Andersen ML. Impact of sex on hyperalgesia induced by sleep loss. *Horm Behav* 2011;59(1):174–9.
266. Altemus M, Rao B, Dhabhar FS, Ding W, Granstein RD. Stress-induced changes in skin barrier function in healthy women. *J Invest Dermatol* 2001;117(2):309–17.
267. Bergmann BM, Kushida CA, Everson CA, Gilliland MA, Obermeyer W, Rechtschaffen A. Sleep deprivation in the rat: II. Methodology. *Sleep* 1989;12(1):42–6.
268. Mullington JM, Simpson NS, Meier-Ewert HK, Haack M. Sleep loss and inflammation. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab* 2010;24(5):775–84.
269. Sigurdardottir LG, Valdimarsdottir UA, Fall K, Rider JR, Lockley SW, Schernhammer E, Mucci LA. Circadian disruption, sleep loss, and prostate cancer risk: A systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(7):1002–11.
270. Lengyel Z, Battyáni Z, Szekeres G, Csernus V, Nagy AD. Circadian clocks and tumor biology: What is to learn from human skin biopsies? *Gen Comp Endocrinol* 2013;188(1):67–74.
271. Relógio A, Thomas P, Medina-Pérez P, Reischl S, Bervoets S, Gloc E, Riemer P, Mang-Fatehi S, Maier B, Schäfer R, Leser U, Herzel H, Kramer A, Sers C. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. *PLoS Genet* 2014;10(5):1–17.
272. Kulkarni K, Schow M, Shubrook JH. Shift workers at risk for metabolic syndrome. *Journal of the American Osteopathic Association* 2019;120: 107–17.
273. Vetter C, Dashti HS, Lane JM, Anderson SG, Schernhammer ES, Rutter MK, Saxena R, Scheer FAJL. Night shift work, genetic risk, and type 2 diabetes in the UK biobank. *Diabetes Care* 2018;41(4):762–9.
274. Kervezee L, Shechter A, Boivin DB, MD. Impact of shift work on the circadian timing system and health in women. *Sleep Med Clin* 2018;13(3):295–306.
275. Costa G. Sleep deprivation due to shift work. *Handb Clin Neurol*

2015;131(24):437–46.

276. Ferri P, Guadi M, Marcheselli L, Balduzzi S, Magnani D, Lorenzo R Di. The impact of shift work on the psychological and physical health of nurses in a general hospital: A comparison between rotating night shifts and day shifts. *Risk Manag Healthc Policy* 2016;9:203–11.

277. Dumont M, Lanctôt V, Cadieux-Viau R, Paquet J. Melatonin production and light exposure of rotating night workers. *Chronobiol Int* 2012;29(2):203–10.

278. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod* 1998;3(1):13–22.

279. Guerrero-Vargas NN, Espitia-Bautista E, Buijs RM, Escobar C. Shift-work: Is time of eating determining metabolic health? Evidence from animal models. *Proceedings of the Nutrition Society* 2017;77:199–215.

280. Toshihiro M, Saito K, Takikawa S, Takebe N, Onoda T, Satoh J. Psychosocial factors are independent risk factors for the development of Type 2 diabetes in Japanese workers with impaired fasting glucose and/or impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 2008;25(10):1211–7.

281. Lowden A, Moreno C, Holmbäck U, Lennernäs M, Tucker P. Eating and shift work - Effects on habits, metabolism, and performance. *Scand J Work Environ Heal* 2010;36(2):150–62.

282. Waterhouse J, Buckley P, Edwards B, Reilly T. Measurement of, and some reasons for, differences in eating habits between night and day workers. *Chronobiol Int* 2003;20(6):1075–92.

283. Cain SW, Filtness AJ, Philips CL, Andersen C. Enhanced preference for high-fat foods following a simulated night shift. *Scand J Work Environ Heal* 2015;41(3):288–93

284. Tada Y, Kawano Y, Maeda I, Yoshizaki T, Sunami A, Yokoyama Y, Matsumoto H, Hida A, Komatsu T, Togo F. Association of body mass index with lifestyle and rotating shift work in Japanese female nurses. *Obesity* 2014;22(12):2489–93.

285. Potter GDM, Cade JE, Grant PJ, Hardie LJ. Nutrition and the circadian system. *Br J Nutr* 2016;116(3):434–42.

286. Bo S, Musso G, Beccuti G, Fadda M, Fedele D, Gambino R, Gentile L, Durazzo M, Ghigo E, Cassader M. Consuming more of daily caloric intake at dinner predisposes to obesity. A 6-year population-based prospective cohort study. *PLoS One* 2014;9(9):1–9.

287. Garaulet M, Abellán PG, Albuquerque-Bejar J, Lee Y-C, Ordova's J, Scheer

- F. Timing of food intake predicts weight loss effectiveness. *Int J Obes* 2013;37(4):604–11.
288. Kohsaka A, Laposky AD, Moynihan Ramsey K, Estrada C, Joshu C, Kobayashi Y, Turek FW, Bass J. High-fat diet disrupts behavioral and molecular Circadian Rhythms in Mice. *Cell Metab* 2007;6(5):414–21.
289. Favero G, Stacchiotti A, Castrezzati S, Bonomini F, Albanese M, Rezzani R, Rodella LF. Melatonin reduces obesity and restores adipokine patterns and metabolism in obese (ob/ob) mice. *Nutr Res* 2015;35(10):891–900.
290. IARC. *IARC Monographs On the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 97th ed. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2008:3-471.
291. Dai H, Zhang L, Cao M, Song F, Zheng H, Zhu X, Wei Q, Zhang W, Chen K. The role of polymorphisms in circadian pathway genes in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2011;127(2):531–40.
292. Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee CC. The circadian gene *Period2* Plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 2002;111:41–50.
293. Filipinski E, Li XM, Lévi F. Disruption of circadian coordination and malignant growth. *Cancer Causes Control* 2006;17(4):509–14.
294. Shah PN, Mhatre MC, Kothari LS. Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods. *Cancer Res* 1984;44(8):3403–7.
295. Gehlert S, Clanton M. Shift work and breast cancer. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(24):1–8.
296. Megdal SP, Kroenke CH, Laden F, Pukkala E, Schernhammer ES. Night work and breast cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer* 2005;41(13):2023–32.
297. Hansen J. Risk of breast cancer after night- and shift work: Current evidence and ongoing studies in Denmark. *Cancer Causes Control* 2006;17(4):531–7.
298. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night Shift work, light at night and risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2001;93:1557–1562
299. Wahl S, Engelhardt M, Schaupp P, Lappe C, Ivanov I V. The inner clock—Blue light sets the human rhythm. *J Biophotonics* 2019;12(12):1–14.
300. Lockley SW, Brainard GC, Czeisler CA. High sensitivity of the human circadian melatonin rhythm to resetting by short wavelength light. *J Clin Endocrinol Metab*

2003;88(9):4502–5.

301. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg²⁺ precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1982;28(6):1379–88.

302. Himbert S, Alsop RJ, Rose M, Hertz L, Dhaliwal A, Moran-Mirabal JM, Verschoor CP, Bowdish DME, Kaestner L, Wagner C, Rheinstädter MC. The molecular structure of human red blood cell membranes from highly oriented, solid supported multi-lamellar membranes. *Sci Rep* 2017;7:1–14.

303. Bligh, E.G. and Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959;37(8):911–7.

304. Broekhuysse RM. Two-dimensional chromatography a detailed picture of the phospholipid composition of normal human erythrocytes and plasma was obtained by quantitative two-dimensional thin-layer chromatography on silica gel containing an alkaline component . Two extra. *Clin Chim Acta* 1968;23(1969):457–61.

305. Arslan AK, Yaşar Ş, Çolak C, Yoloğlu S. R Shiny Paketi ile Kruskal Wallis H testi için interaktif bir web uygulaması. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilim Derg* 2018;7(2):49–55.

306. Schmid PC, Ilona S, Schmid HHO. Incorporation of exogenous fatty acids into molecular species of rat hepatocyte phosphatidylcholine. *Arch Biochem Biophys* 1995;322(2):306–12.

307. Franks PW, McCarthy MI. Exposing the exposures responsible for type 2 diabetes and obesity. *Science* 2016;354(6308):69–73.

308. Javeed N, Matveyenko A V. Circadian etiology of type 2 diabetes mellitus. *Physiology* 2018;33(2):138–50.

309. März W, Kleber ME, Scharnagl H, Speer T, Zewinger S, Ritsch A, Parhofer KG, von Eckardstein A, Landmesser U, Laufs U. HDL cholesterol: reappraisal of its clinical relevance. *Clin Res Cardiol* 2017;106(9):663–75.

310. Krauss RM. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27(6):1496–504.

311. Hulsegge G, Picavet HSJ, Van Der Beek AJ, Verschuren WMM, Twisk JW, Proper KI. Shift work, chronotype and the risk of cardiometabolic risk factors. *Eur J Public Health* 2019;29(1):128–34.

312. Morken T, Bohov P, Skorve J, Ulvik R, Aukrust P, Berge RK, Livden, JK. Anti-inflammatory and hypolipidemic effects of the modified fatty acid tetradecylthioacetic

- acid in psoriasis - A pilot study. *Scand J Clin Lab Invest* 2011;71(4):269–73.
313. Ramezani M, Zavattaro E, Sadeghi M. Evaluation of serum lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in psoriatic patients: A systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Postep Dermatologii i Alergol* 2019;36(6):692–707.
314. Hirano T. Pathophysiology of diabetic dyslipidemia. *J Atheroscler Thromb* 2018;25(9):771–82.
315. Keskin FE, Yumuk V. Diabetes mellitus ve dislipidemi. *Lipid Bozuklukları ve Ateroskler* 2013;19:152–63.
316. Durrington PN, Newton RS, Weinstein DB, Steinberg D. Effects of insulin and glucose on very low density lipoprotein triglyceride secretion by cultured rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1982;70(1):63–73.
317. Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: Insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1985;110(5):1100–7.
318. U.K. Prospective Diabetes Study 27. Plasma lipids and lipoproteins at diagnosis of NIDDM by age and sex U.K. *Diabetes Care* 1997;20(11):1683–7.
319. Sadacca LA, Lamia KA, DeLemos AS, Blum B, Weitz CJ. An intrinsic circadian clock of the pancreas is required for normal insulin release and glucose homeostasis in mice. *Diabetologia* 2011;54(1):120–4.
320. Depner CM, Stothard ER, Wright KP. Metabolic consequences of sleep and circadian disorders. *Curr Diab Rep* 2014;14(507):1–9.
321. Paradis ME, Lamarche B. Endothelial lipase: Its role in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 2006;22:31B-34B.
322. Mahley RW, Palaoglu KE, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM, Cheung V, Onat H, Fulks P, Mahley LL, Vakar F, Ozbayrakci S, Gokdemir O, Winkler W. Turkish heart study: Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995;36(4):839–59.
323. Van Haperen R, Van Tol A, Vermeulen P, Jauhiainen M, Van Gent T, Van Den Berg P, Ehnholm S, Grosveld F, Van Der Kamp A, De Crom R. Human plasma phospholipid transfer protein increases the antiatherogenic potential of high density lipoproteins in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20(4):1082–8.
324. Jiang XC, Bruce C, Mar J, Lin M, Ji Y, Francone OL, Tall, AR. Targeted mutation of plasma phospholipid transfer protein gene markedly reduces high-density lipoprotein levels. *J Clin Invest* 1999;103(6):907–14.

325. Yu Y, Guo S, Feng Y, Feng L, Cui Y, Song G, Luo T, Zhang K, Wang Y, Jiang XC, Qin S. Phospholipid transfer protein deficiency decreases the content of S1P in HDL via the loss of its transfer capability. *Lipids* 2014;49(2):183–90.
326. Jiang XC. Phospholipid transfer protein: Its impact on lipoprotein homeostasis and atherosclerosis. *J Lipid Res* 2018;59(5):764–71.
327. Zou L, Guo L, Zhu C, Lai Z, Li Z, Yang A. Serum phospholipids are potential biomarkers for the early diagnosis of gastric cancer. *Clin Chim Acta* 2021;519(5):276–84.
328. Bondarenko LA, Babenko NA. Effect of long-term around the clock illumination on rabbit serum phospholipids. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 2006;92(3):318–23.
329. Zeng C, Wen B, Hou G, Lei L, Mei Z, Jia X, Chen X, Zhu W, Li J, Kuang Y, Zeng W, Su J, Liu S, Peng C, Chen X. Lipidomics profiling reveals the role of glycerophospholipid metabolism in psoriasis. *Gigascience* 2017;6(10):1–11.
330. Floegel A, Stefan N, Yu Z, Mühlenbruch K, Drogan D, Joost HG, et al. Identification of serum metabolites associated with risk of type 2 diabetes using a targeted metabolomic approach. *Diabetes* 2013;62(2):639–48.
331. Deevska GM, Rozenova KA, Giltiy N V., Chambers MA, White J, Boyanovsky BB, Wei J, Daugherty A, Smart EJ, Reid MB, Merrill AH, Nikolova-Karakashian M. Acid sphingomyelinase deficiency prevents diet-induced hepatic triacylglycerol accumulation and hyperglycemia in mice. *J Biol Chem* 2009;284(13):8359–68.
332. Papathanasiou A, Kostara C, Cung MT, Seferiadis K, Elisaf M, Bairaktari E, Goudevenos IA. Analysis of the composition of plasma lipoproteins in patients with extensive coronary heart disease using ¹H NMR spectroscopy. *Hell J Cardiol* 2008;49(2):72–8.
333. Holzer M, Wolf P, Curcic S, Birner-Gruenberger R, Weger W, Inzinger M, El-Gamal D, Wadsack C, Heinemann A, Marsche G. Psoriasis alters HDL composition and cholesterol efflux capacity. *J Lipid Res* 2012;53(8):1618–24.
334. Pretorius E, Du Plooy JN, Bester J. A comprehensive review on eryptosis. *Cell Physiol Biochem* 2016;39(5):1977–2000.
335. Pacetti D, Gagliardi R, Balzano M, Frega NG, Ojeda ML, Borrero M, Ruiz A, Lucci P. Changes in the fatty acid profile and phospholipid molecular species composition of human erythrocyte membranes after hybrid palm and extra Virgin Olive Oil supplementation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2016;64: 5499–507.

336. Kravets TY, Stepovaya EA, Koshchevets TY, Matyusheva BN, Bulanova AA, Mukhacheva OV, Ananina EA. Erythrocyte membranes in metabolic syndrome. *Probl Endokrinol* 2009;55(5):23–5.

337. Kuypers FA. Hemoglobin S polymerization and red cell membrane changes. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;28(2):155–79.



EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ







EK 2. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Sizi Prof.Dr.Tayfun GÜLDÜR tarafından yürütülen “ Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Serum-HDL-Eritrosit Membranı Arasında Fosfolipid Trafikği” başlıklı araştırmaya davet ediyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmama kararını vermeden önce, araştırmanın neden ve nasıl yapılacağını bilmeniz gerekmektedir. Bu nedenle bu formun okunup anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmaya katılmak tamamen **gönüllülük** esasına dayanmaktadır. Eğer anlayamadığınız ve sizin için açık olmayan şeyler varsa, ya da daha fazla bilgi isterseniz bize sorunuz. Çalışmaya **katılmama** veya katıldıktan sonra herhangi bir anda çalışmadan **çıkma** hakkında sahibsiniz. Çalışmadan ayrılmanız durumunda herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmayacak olup, hiçbir hak kaybına uğramadan araştırmaya katılmayı reddedebilir veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllünün veya kanuni temsilcisi zamanında bilgilendirilecektir. Bu formlardan elde edilecek bilgiler tamamen **Araştırma amacı** ile kullanılacaktır. **Araştırma yayınlsa bile isminiz ve kimlik bilgileriniz kesinlikle gizli kalacak ve 3. bir şahsa verilmeyecektir.** Sizlerden biyolojik materyaller (kan, idrar, doku vs.) alındığı taktirde materyallerin neler olduğunu, hangi amaçla alındığı ve analizlerinin nerede yapılacağına dair bilgiler (analizlerin yurtdışında yapılması durumunda biyolojik materyallerin nereye gönderileceğinin açıklanması) verilecektir. Hazırlamış olduğumuz Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu, gönüllü veya kanuni temsilcisinin yasal haklarını ortadan kaldıracak bir hüküm veya ifade içermez ayrıca araştırmacıyı, kurumu, destekleyici veya bunların temsilcilerini kendi ihmallerinden kaynaklanan herhangi bir yükümlülükten kurtaracak hüküm veya ifade taşıyamaz.

18 yaşının altındaki katılımcı/gönüllülerin, velayet veya vesayetindeki yasal temsilcilerine gerekli açıklamalar yapılarak bilgilendirildi. Çalışma için gerekli İzin/Onam alındı. **Çalışmaya katılmanız, soruları yanıtlamanız, araştırmaya katılım için onam/onay verdiğiniz anlamına gelmektedir.** Size verilen formlardaki soruları yanıtlarken kimsenin baskısı veya telkini altında olmayınız.

1. Araştırmanın açık adı: Sirkadiyen Ritim Bozukluklarında Serum-HDL-Eritrosit Membranı Arasında Fosfolipid Trafikği
2. Gönüllüye çalışmanın bir araştırma olduğunu açıkladınız mı? Evet
3. Araştırmanın amacı nedir?

Bu projenin amacı; sirkadiyen ritim bozukluğuna yol açtıkları bilinen patolojiler arasından seçilen dört durumda, metformin kullanan hastalar, psöriazisli hastalar ve gece vardiyasında çalışanlarda ve diyabet tanısını yeni alan hastalarda serum – HDL lipoprotein – eritrosit membranı arasındaki fosfolipid trafikğinin ortaya koyulması amacıyla bu trafikte rol alan enzimlerin düzeylerinin (PLTP, LCAT, EL ve salgısal PLA₂) ve bu enzimler ile bağlantılı olarak üç katmandaki (serum-HDL-eritrosit membranı) fosfolipid kompozisyonunun ortaya koyulması ve tüm bu verilerin sağlıklı bireylerden elde edilenler ile karşılaştırılmasıdır.

Modern yaşam tarzının bir sonucu olarak yaygınlaşan, obezite, tip 2 diyabet ve koroner kalp hastalıkları gibi kronik hastalıkların etiyolojisindeki önemli rolü ortaya konulmuş olan sirkadiyen ritim bozukluklarının kan fosfolipid homeostazisinde sebep oldukları değişimlerin ortak motifini ve mekanizmasını aydınlatarak, sirkadiyen ritim bozukluklarının teşhisi ve tedavisine yönelik olarak kullanılabilir yeni yaklaşımların ve

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

hedeflerin ortaya konulması bu projenin ana gerekçesidir. Serum-HDL lipoproteinler ve eritrosit membranı arasında fosfolipid transferi ve değişimlerine yol açan ve bu proje kapsamında düzeyleri tespit edilecek olan proteinler aterosklerozis ile bağlantılı olduklarından , mevcut projenin sonuçları ile sirkadiyen ritim bozuklukları ile koroner kalp hastalıkları arasındaki bağlantının aydınlatılması bu projenin bir diğer önemli gerekçesidir.

4. Gönüllünün araştırmaya devam etmesi için öngörülen süre nedir? Sadece kan alımı ile sınırlıdır.
5. Araştırmaya katılması beklenen tahmini gönüllü sayısı nedir?125
6. Varsa araştırmada uygulanacak tedaviler nelerdir? Yok
7. Varsa farklı tedaviler için gönüllülerin araştırma gruplarına rastgele atanma ihtimali var mı? -
8. Araştırma sırasında uygulanacak olan invazif yöntemler dâhil olmak üzere izlenecek veya gönüllüye uygulanacak yöntemlerin tümünü anlayabileceği ifadelerle açıklayınız: -
9. Araştırmanın deneysel kısımlarını açıklayınız: Çalışmada TÖTM'e başvuran psöriazis hastalarının, yeni diyabet tanısı almış hastaların, metformin kullanan hastaların ve gece vardiyasında çalışan hastane personelinin ve gönüllü sağlıklı bireylerin kan numuneleri alınacaktır. Fosfolipid analizleri HPLC/TLC yöntemiyle gerçekleştirilecektir. Plazma PLTP, LCAT, PLA₂, EL ve melatonin analizleri ELİSA yöntemiyle gerçekleştirilecektir. Kortizol analizi kemilüminesans yöntemle gerçekleştirilecektir. HDL-Kolesterol konsantrasyon ölçümü kolorimetrik-end point reaksiyonla gerçekleştirilecektir.
10. Gönüllünün maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar (araştırma hamilelerde veya lohusalarda yapılacak ise embriyo, fetüs veya süt çocuklarının da maruz kalacağı öngörülen riskler veya rahatsızlıklar dahil olmak üzere) açıklayınız: Herhangi bir risk içermemektedir.
11. Araştırmadan makul ölçüde beklenen yararlarla ilgili olarak gönüllü açısından hedeflenen herhangi bir klinik yarar olmadığında gönüllünün bu durum hakkında bilgilendirilecek mi? -
12. Gönüllüye uygulanabilecek olan alternatif yöntemler veya tedavi şeması ve bunların olası yarar ve risklerini açıklayınız: -
13. İlgili mevzuat gereğince gerekiyorsa gönüllüye verilecek tazminat (sigorta) ve / veya sağlanacak tedaviler, gereken masraflar..... tarafından karşılanacaktır.
Herhangi bir risk içermemektedir.
14. Varsa, gönüllülere yapılacak ulaşım, yemek gibi masraflara ilişkin ödemeler tarafından karşılanacaktır. -
15. Gönüllülerin sorumlulukları nelerdir, yazılı olarak listeyerek gönüllüye imzalatmış mı? -

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLARDA ARANACAK KİŞİ

Uygulama süresince, zorunlu olarak araştırma katıldığınızda Sorumlu Araştırmacıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da araştırma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki veya diğer rahatsızlıklarınız için herhangi bir saatte adresi ve telefonu aşağıda belirtilen ilgili hekime ulaşabilirsiniz.

İstediğinizde Günü 24 Saati Ulaşılabilir Araştırmacınızın Adres ve Telefonları:

Arş.Gör.Dr. Fatma ÖLMEZ BUDAK

İş: 0422 341 0660-3316 Cep: (Mutlaka doldurulmalıdır. İş telefonu yeterli değildir)

MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum. Bu koşullarda söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

GÖNÜLLÜ		İMZASI:
ADI-SOYADI		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMAYA KATILMA ONAYI

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum ve çocuğuma anlayacağı şekilde açıkladım. Çocuğumun araştırmadan istediği zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğini biliyorum. Çocuğumun Anne/ Baba veya yasal vasi (kanuni temsilci) olarak araştırmaya gönüllü olarak katılmasına hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla kabul ediyorum.

VELİ/ VASİ (Varsa)		İMZASI:
ADI-SOYADI		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		

ARAŞTIRMACI		İMZASI:
ADI-SOYADI ve GÖREVİ		
ADRES		
TELEFON		
TARİH		